

Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Tumorspezifisches *Targeting* der humanen
Natürlichen Killerzelllinie YT durch
Gentransfer chimärer Immunglobulin-T-
Zellrezeptoren**

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Diplom-Biochemiker Thomas Schirrmann
geb. am 23.04.1973 in Berlin

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Thomas Buckhout

Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Uckert
 2. Prof. Dr. Stefan Dübel
 3. PD Gabriele Pecher

eingereicht: 8.11.2004

Datum der Promotion: 18.03.2005

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Abstract	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	12
1.1 Immuntherapie von Tumorerkrankungen	12
1.2 Adoptive zelluläre Immuntherapie	14
1.2.1 Prinzip der adoptiven Immuntherapie	14
1.2.2 Adoptive Immuntherapie mit autologen LAK-Zellen und TILs	14
1.2.3 In-vitro-Sensitivierung von autologen T-Zellen	15
1.2.4 Genmodifikation von Lymphozyten zur Verbesserung ihrer Erkennungs- und Effektoreigenschaften	15
1.2.5 Adoptive Immuntherapie mit autologen NK-Zellen	16
1.2.6 Probleme autologer Strategien einer adoptiven Immuntherapie	17
1.2.7 Allogene Spenderlymphozyteninfusionen	17
1.2.8 Adoptive Immuntherapie mit tumorspezifischen Effektorzelllinien	18
1.3 Tumorassoziierte Antigene	19
1.3.1 Einteilung der Tumorantigene	19
1.3.2 Das karzinoembryonale Antigen (CEA)	20
1.3.3 CD33, ein Marker akuter myeloischer Leukämien	22
1.4 Immunologische „Escape-Mechanismen“ von Tumoren	22
1.4.1 Toleranzinduktion durch den Tumor	22
1.4.2 Veränderte MHC-Expression auf Tumoren	23
1.4.3 Tumorinduzierte Immunmodulation und -suppression	23
1.5 Natürliche Killerzellen	24
1.5.1 Allgemeine Eigenschaften von NK-Zellen	24
1.5.2 Erkennungsmechanismen der NK-Zellen	25
1.5.3 NK-Zellrezeptoren	26
1.5.4 Adhäsionsmoleküle	29
1.5.5 Signaltransduktion	30
1.5.6 Zytotoxische Mechanismen der NK-Zellen	31
1.5.7 Eigenschaften der humanen NK-Zelllinie YT	33
1.6 Rekombinante Antikörper für ein Immuntargeting	34
1.6.1 Antikörper	34
1.6.2 Erzeugung humaner Antikörper	35

1.6.3	Konstruktion von single-chain-Antikörper-Fragmenten	36
1.6.4	Displaytechnologien zur Isolation von Antikörperfragmenten	38
1.6.5	Expression von scFv-Fragmenten	38
1.6.6	Bispezifische Antikörper für ein Immuntargeting	39
1.7	Tumorspezifische Rezeptoren für ein Immuntargeting	40
1.7.1	Voraussetzungen an ein rezeptorvermitteltes Targeting	40
1.7.2	Rekombinante T-Zellrezeptoren für das Targeting von NK-Zellen	40
1.7.3	Targeting von Lymphozyten mit rekombinanten TCR-Konstrukten	42
2	Zielsetzung	44
3	Material und Methoden	45
3.1	Allgemeine Geräte	45
3.2	Zellkultur	45
3.2.1	Zelllinien	45
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	46
3.2.3	Isolation von humanen peripheren Blutlymphozyten	47
3.2.4	Kalziumphosphattransfektion der 293T-Zellen	47
3.3	Antikörperfärbungen	48
3.3.1	Durchflußzytometrische Analyse von Oberflächenmarkern	49
3.3.2	Intrazelluläre FACS-Analyse	49
3.4	Allgemeine molekularbiologische Methoden	50
3.4.1	Bakterienkultur	50
3.4.2	Allgemeine Methoden bei der DNA-Klonierung	51
3.4.3	Enzymreaktionen bei der DNA-Klonierung	52
3.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	53
3.4.5	Isolation der Gesamt-cDNA humaner Blutlymphozyten	54
3.4.6	DNA-Sequenzierung	55
3.4.7	Immunodotblot	55
3.4.8	ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	56
3.4.9	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
3.4.10	Westernblot	57
3.5	Konstruktion der single-chain-Fv-Fragmente	58
3.5.1	Konstruktion der CEA-spezifischen scFv-Fragmente scBW431/26 und scBW431/26-Yol	58
3.5.2	Konstruktion des phOx-spezifischen scFv-Fragments scPhOx	59
3.5.3	Expression und Westernblot-Analyse der scFv-Fragmente in E. coli	60
3.5.4	Reinigung und Bindungsanalyse der scFv-Fragmente	60
3.6	Konstruktion der scFv-hFc-Fusionsproteine	61

3.6.1	Konstruktion des sekretorischen Signalpeptids	61
3.6.2	Isolation des humanen IgG1-Fc-Teils	61
3.6.3	Konstruktion der scFv-hFc-Proteine scBW431/26-hFc und scPhOx-hFc	62
3.6.4	Konstruktion des scHuM195-hFc-Proteins	62
3.6.5	Expression und Analyse der scFv-hFc-Proteine	63
3.7	Herstellung chimärer Immunglobulin-T-Zellrezeptoren	64
3.7.1	Isolation der cDNA der humanen CD3 ζ -Kette	64
3.7.2	Konstruktion der chimären Immunglobulin-T-Zellrezeptorkonstrukte	64
3.7.3	Expression und Analyse der clgTCR-Konstrukte in den 293T-Zellen	65
3.8	Antigenexpression auf Tumorzellen	65
3.8.1	FACS-Analyse phOx-markierter Zellen mit dem scPhOx-hFc-Protein	65
3.8.2	FACS-Analyse von Tumorzelllinien mit dem scBW431/26-hFc-Protein	65
3.8.3	FACS-Analyse von Leukämiezelllinien mit dem scHuM195-hFc-Protein	66
3.9	Genmodifikation der humanen NK-Zelllinie YT	66
3.9.1	Gentransfer der clgTCR-Konstrukte in die YT-Zellen	66
3.9.2	Analyse der clgTCR-Expression der transfizierten YT-Zellen	66
3.9.3	Immunologische Anreicherung der clgTCR ⁺ YT-Zellen	67
3.10	Zytotoxizitätsstudien	67
3.10.1	⁵¹ Cr-Freisetzungssassay	67
3.10.2	Durchflußzytometrischer Zytotoxizitätsassay	69
3.10.3	Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen	70
3.10.4	Zytotoxizität der scHuM195-hFc ζ ⁺ YT-Zellen	70
3.10.5	Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ ⁺ YT-Zellen	70
3.10.6	Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen in Gegenwart von freiem CEA-Protein	70
3.10.7	Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ ⁺ YT-Zellen in Gegenwart von gelöstem PhOx-BSA mit einzelnen und multiplen PhOx-Gruppen	71
3.10.8	Wirkung von gelöstem PhOx-BSA mit einzelnen und multiplen PhOx-Gruppen auf die Antigenbindung des scPhOx-hFc-Proteins	71
3.11	Studien mit bestrahlten clgTCR⁺ YT-Zellen	72
3.11.1	Bestrahlung der YT-Zellen	72
3.11.2	Bestimmung der lethalen Strahlendosis für die YT-Zelllinie	72
3.11.3	Zytotoxizität der bestrahlten scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen	72
3.12	Maustumormodell	73
3.12.1	Etablierung des Maustumormodells	73
3.12.2	Adoptiver Transfer bestrahlter scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen zur Behandlung minimaler CEA ⁺ MC32A-Tumore	73
3.12.3	Adoptiver Transfer von scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen zur Bekämpfung etablierter CEA ⁺ MC32A-Tumore	73

3.12.4 Statistik	73
3.13 Abstoßung der clgTCR⁺ YT-Zellen durch allogene Lymphozyten	74
3.13.1 Zytotoxizität allogener PBL und NK-Zellen gegenüber den clgTCR ⁺ YT-Zellen	74
3.13.2 Zytotoxizität allogener PBL nach Kokultivierung mit bestrahlten clgTCR ⁺ YT-Zellen	74
4 Ergebnisse	75
4.1 Konstruktion chimärer Immunglobulin-T-Zellrezeptoren	75
4.1.1 Konstruktion der CEA- und PhOx-spezifischen scFv-Fragmente	75
4.1.2 Bakterielle Expression und Bindungsanalyse der scFv-Fragmente scBW431/26, BW431/26-Yol, scPhOx und PhOx-Yol	77
4.1.3 Konstruktion von scFv-hFc-Fusionsproteinen aus den scFv-Fragmenten scBW431/26 und scPhOx	79
4.1.4 Expression und Analyse der Bindungseigenschaften der scFv-hFc-Fusionsproteine scBW431/26-hFc und scPhOx-hFc	81
4.1.5 Konstruktion und Expression des scFv-hFc-Fusionsproteins scHuM195-hFc	83
4.1.6 Isolation der CD3 ζ-Kette	83
4.1.7 Konstruktion der chimären Immunglobulin-T-Zellrezeptoren	85
4.2 Antigenexpression auf den Tumorzelllinien	87
4.2.1 Färbung PhOx-markierter Zelllinien durch das scPhOx-hFc-Protein	87
4.2.2 FACS-Analyse von Tumorzelllinien mit dem scBW431/26-hFc-Protein	87
4.2.3 FACS-Analyse von myeloischen Leukämiezelllinien mit dem scHuM195-hFc-Protein	90
4.3 Gentransfer der clgTCR-Konstrukte in die humane NK-Zelllinie YT	92
4.3.1 Elektroporation der YT-Zellen mit den clgTCR-Genkonstrukten	92
4.3.2 Immunologische Anreicherung der clgTCR ⁺ YT-Zellen	92
4.4 Zytotoxizitätsstudien mit den clgTCR⁺ YT-Zellen	94
4.4.1 Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ ⁺ YT-Zellen	94
4.4.2 Zytotoxizität der scHuM195-hFcζ ⁺ YT-Zellen	98
4.4.3 Zytotoxizität der scPhOx-hFcζ ⁺ YT-Zellen	99
4.4.4 Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ ⁺ YT-Zellen in Gegenwart von gelöstem CEA-Protein	100
4.4.5 Zytotoxizität der scPhOx-hFcζ ⁺ YT-Zellen in Gegenwart von gelöstem PhOx-BSA-Protein mit einzelnen oder multiplen PhOx-Gruppen	101
4.4.6 Bindungsinhibition des scPhOx-hFc-Proteins in Gegenwart von freiem PhOx-BSA mit einzelnen oder multiplen PhOx-Gruppen	102
4.5 Studien mit γ-bestrahlten scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen	104
4.5.1 Wachstumsinhibition der YT-Zellen durch γ-Bestrahlung	104
4.5.2 Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ ⁺ YT-Zellen nach γ-Bestrahlung	105

4.6	Maustumormodell	107
4.6.1	Adoptiver Transfer bestrahlter scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen zur Behandlung minimaler CEA ⁺ MC32A-Tumore in NOD/SCID-Mäusen	107
4.6.2	Adoptiver Transfer bestrahlter scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen zur Bekämpfung etablierter CEA ⁺ MC32A-Tumore	109
4.7	Sensibilität der clgTCR⁺ YT-Zellen gegenüber alloge- nen Lymphozyten	110
4.7.1	Abstoßung der clgTCR ⁺ YT-Zellen durch allogene PBL und NK-Zellen	110
4.7.2	Stimulation allogener Lymphozyten durch die clgTCR ⁺ YT-Zellen	111
5	Diskussion	112
5.1	Tumorspezifische chimäre Immunglobulin-T-Zellrezeptoren für ein Targeting der NK-Zelllinie YT	113
5.2	Antigenexpression auf den Tumorzellen	118
5.3	Genetische Modifikation der humanen NK-Zelllinie YT	121
5.4	Zytotoxizität der genmodifizierten clgTCR ⁺ YT-Zellen	123
5.5	Studien mit bestrahlten scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen	130
5.6	Maustumormodell	131
5.7	Allogene Abstoßung der clgTCR ⁺ YT-Zellen	133
5.8	Potential der clgTCR ⁺ YT-Zellen für die klinische Anwendung	135
	Anhang	143
	Danksagung	151
	Eidesstattliche Erklärung	152
	Literaturverzeichnis	153

Zusammenfassung

Die spezifische adoptive Immuntherapie ist ein hoffnungsvoller Ansatz zur Behandlung von Tumoren. Die aufwendige individuelle Bereitstellung primärer Effektorlymphozyten könnte durch den Einsatz etablierter tumorantigen-spezifischer Effektorzelllinien vermieden werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich ein *Tumortargeting* der humanen Natürlichen Killer-(NK)-Zelllinie YT durch den Gentransfer chimärer Immunglobulin-T-Zellrezeptoren (clgTCRs) erreichen läßt. Die clgTCR-Konstrukte wurden aus *single-chain-Fv*-Fragmenten (scFv), dem IgG1-Fc-Teil und der CD3 ζ -Signalkette erzeugt. Die scFv-Fragmente wurden aus den humanisierten Antikörpern BW431/26 und HuM195, die spezifisch für das karzinoembryonale Antigen (CEA) bzw. CD33 sind, konstruiert und zeigten als scFv-hFc-Fusionsproteine eine spezifische Bindung an Tumorzellen. Die YT-Zellen wurden mit den clgTCR-Genkonstrukten über Elektroporation transfiziert und über immunologische Verfahren angereichert. *In-vitro*-Studien ergaben eine spezifische Lyse von CEA⁺ Kolonkarzinomzelllinien durch die scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen. Die Zytotoxizität korrelierte mit der Expression des clgTCR-Antigens auf den Tumorzellen und wurde durch zirkulierendes CEA nicht gehemmt. Die scHuM195-hFc ζ ⁺ YT-Zellen zeigten eine spezifische Lyse der CD33⁺ myeloischen Leukämiezelllinie KG1. Die γ -Bestrahlung wurde zur Wachstumsbegrenzung der YT-Zellen eingesetzt. Die spezifische Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen gegenüber CEA⁺ Tumorzellen war einen Tag nach Bestrahlung unverändert. Die Koinjektion von CEA⁺ Tumorzellen mit bestrahlten scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen führte zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums in NOD/SCID-Mäusen. Die clgTCR⁺ YT-Zellen zeigten *in vitro* eine geringe Sensibilität gegenüber allogenen Blutlymphozyten. Die Ergebnisse zeigen, daß die Zytotoxizität der NK-Zelllinie YT tumorantigen-spezifisch durch clgTCR-Gentransfer erweitert werden kann und ein Potential zur Behandlung von minimalen Tumorerkrankungen besteht.

Schlagwörter:

Gentransfer, Natürliche Killerzellen, chimäre Immunglobulin-T-Zellrezeptoren, adoptive Immuntherapie, Tumortargeting

Abstract

The specific adoptive immunotherapy is a promising strategy for cancer treatment. The utilization of established tumor antigen specific effector cell lines could bypass the expendable individual preparation and often limited specificity of primary effector lymphocytes. This study investigated the tumor targeting of the human Natural Killer (NK) cell line YT by gene transfer of chimeric immunoglobulin T cell receptors (clgTCRs). The clgTCR constructs were generated of single chain antibody fragments (scFv), the IgG1 Fc part and the CD3 ζ chain. The scFv fragments were constructed of the humanized antibodies BW431/26 and HuM195 with specificity for the carcinoembryonic antigen (CEA) and CD33, respectively, and showed as scFv-Fc fusion proteins a specific binding to tumor cells. YT cells were transfected with the clgTCR gene constructs by electroporation and enriched by immunological cell separation. *In vitro* studies revealed a specific lysis of CEA⁺ colon carcinoma cell lines by scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT cells. The cytotoxicity correlated with the expression of the clgTCR antigen on the tumor cells and was not inhibited in the presence of soluble CEA. The scHuM195-hFc ζ ⁺ YT cells mediated a specific lysis of the CD33⁺ myeloic leukemia cell line KG1. The γ -irradiation was used to limit the growth of the YT cell line. The specific cytotoxicity of the scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT cells against CEA⁺ tumor cells was unaltered one day after irradiation. The coinjection of CEA⁺ tumor cells and irradiated scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT cells led to a significant growth inhibition in NOD/SCID mice. The clgTCR⁺ YT cells showed a low susceptibility to the cytotoxicity of allogeneic blood lymphocytes *in vitro*. The results demonstrated that the cytotoxicity of the human NK cell line YT can be specifically extended to tumor antigens by clgTCR gene transfer. The employment of receptor gene modified YT cells could be a useful tool for the adoptive immunotherapy of minimal tumor diseases.

Keywords:

Gene transfer, Natural Killer cells, chimeric immunoglobulin T cell receptors, adoptive immunotherapy, tumor targeting

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod (<i>activation induced death</i>)
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
bp (kB)	Basenpaare (Kilo-bp)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C-terminal	carboxyterminal
C-Domäne	konstante Domänen von Antikörpern und T-Zellrezeptoren
CD	Nomenklatur für Differenzierungsantigenen basierend auf Antikörpern (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA, die nach reverser Transkription aus der mRNA erhalten wird (<i>complementary DNA</i>)
CDR	hypervariable Bereiche der variablen Regionen von Antikörpern und TCRs (<i>complementarity determining region</i>)
CFSE	Carboxyfluoresceinsucciminidylester (-Diacetat)
CH, C _H	C-Domänen der schweren Antikörperkette
CL, C _L	C-Domäne der leichten Antikörperkette
CMV	Cytomegalovirus
cpm	<i>counts per minute</i>
CTL	zytotoxische T-Zellen (<i>cytotoxic T-lymphocytes</i>)
Da	Dalton (Molekulargewichtseinheit 1 Da = 1 g/mol)
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr Virus
ERK2	<i>extracellular signal regulatory kinase</i>
E : T	Effektor : Target-Verhältnis
Fab'	N-terminale Fragmente von Antikörpern nach proteolytischer Spaltung mit Papain
F(ab') ₂	Fab'-Dimer von Antikörpern nach proteolytischer Spaltung mit Pepsin
FACS	Durchflußzytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
Fc	Fc-Teil von Antikörpern (<i>crystallizable fragment</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-1, -2, -3	Detektoren für Fluoreszenzbereiche bei der FACS-Analyse
FSC	Detektor für Vorwärtsstreuung bei der FACS-Analyse (<i>forward scatter</i>)
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>

GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GvL	antileukämischer Effekt transplanteder Lymphozyten (<i>graft versus leukemia</i>)
GvHD	gegen den Wirt gerichtete Erkrankung ausgelöst durch allogene Spenderlymphozyten (<i>graft versus host disease</i>)
Gy	Gray, Einheit für die Strahlendosis (1 Gy = 100 rad)
h...	human
HAMA	humane Anti-Mausantikörper (<i>human anti mouse antibodies</i>)
HLA	humane MHC-Moleküle (<i>human leukocyte antigen</i>)
HRPo	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse radish peroxydase</i>)
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IFN	Interferon
<i>in situ</i>	<i>lat.</i> : am natürlichen Ort; z. B. im Gewebe oder Gewebsschnitt
<i>in vitro</i>	<i>lat.</i> : im (Reagenz-)glas
<i>in vivo</i>	<i>lat.</i> : am Lebendigen; im lebenden Organismus
IMAC	<i>metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropylgalaktosid
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine activatory motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine inhibitory motif</i>
KIR	<i>killer immunoglobulin-like receptor</i>
<i>lac</i>	Laktose-Operon
<i>lacI</i>	<i>lac</i> -Repressor (Laktose-Operon)
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LFA-1	<i>leucocyte function-associated antigen-1</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<i>mdr1</i>	<i>multiple drug resistance</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
<i>mock</i>	mit Leerplasmiden transfizierte Zellen, die als Kontrolle dienen
MWCO	Ausschlußmolekulargewicht (<i>molecular weight cut off</i>)
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	<i>nonobese</i> (nicht-fettleibige) <i>diabetic</i> , Mäuse ohne NK-Zellen
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i>
N-terminal	aminoterminal
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBL	periphere Blutlymphozyten

PBMC	periphere mononukleäre Zellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	physiologischer Phosphat-NaCl-Puffer (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PhOx	4-Ethoxymethylen-2-Phenyl-2-Oxazolin-5-on
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonukleasen
RT	Raumtemperatur (20 – 25°C)
SCID	V(D)J-Rekombinase-Defekt, Un-fähigkeit zur somatischen Rekombination, Mäuse ohne B- und T-Zellen (<i>severe combined immunodeficiency</i>)
SCT	Stammzelltransplantation (<i>stem cell transplantation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH2	Sequenzmotiv mit src-Homologie
SHP-1	SH2-containing protein tyrosine phosphatase
SSC	Detektor für Seitwärtsstreuung bei der FACS-Analyse (<i>sideward scatter</i>)
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TAP	<i>transporter associated protein</i>
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
Th1, Th2	T-Helferzellen (Typ 1 und 2)
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TNP	2,4,6-Trinitrophenol
U	<i>Unit</i> (u. a. Enzymaktivitätseinheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Strahlung
v	Volumen
V-Region	variable Regionen von AK und TCR
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
V _H	V-Region der schweren Antikörperkette (<i>heavy chain</i>)
V _L	V-Region der leichten Antikörperkette (<i>light chain</i>)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w	Gewicht (<i>weight</i>)
ZAP70	ζ -associated protein 70

1 Einleitung

1.1 Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Dem Immunsystem wurde schon früh eine zentrale Rolle bei der Kontrolle und Bekämpfung von Tumorerkrankungen beigemessen. Paul Ehrlich stellte 1909 die These auf, daß „die Zerstörung von spontan auftretenden Tumoren, die ständig und gehäuft auftreten, eine der Aufgaben des Immunsystems“ sei. Auf die Bedeutung lymphoider Zellen bei der Abstoßung transplantierte Tumore in Tiermodellen wies 1926 J. B. Murphy (Murphy, 1926) hin. 1959 führte F. M. Burnet (Burnet, 1970) das Konzept der **Immunüberwachung** (*immune surveillance*) von Tumoren ein, das vom Auftreten neuer Antigene auf den Tumorzellen und ihrer Erkennung durch T-Zellen ausging. Diese These wurde durch ein vermehrtes Auftreten von Tumoren nach Einsatz immunsupprimierender Medikamente oder nach Erkrankung an AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) gestützt. Diese Beobachtungen waren jedoch beschränkt auf seltene Tumorarten, wie UV-bedingte Hauttumore oder virusassoziierte Tumore (Boshoff und Weiss, 2002), und konnten nicht für die spontan auftretenden häufigen Tumorarten wie Brust-, Dickdarm- und Lungenkrebs bestätigt werden (Myking, 1969; Penn, 2000). Außerdem waren die experimentellen Maustumormodelle, auf deren Grundlage das Immunüberwachungskonzept entwickelt wurde, viel immunogener als natürliche humane Tumore. Bis heute wird kontrovers diskutiert, ob eine direkte und ständige Immunüberwachung spontan auftretender Tumore stattfindet und ihr Aussetzen die Ursache für die Tumorentstehung ist. Unumstritten ist dagegen, daß das Immunsystem über effiziente Mechanismen zur Erkennung und Bekämpfung von Tumorzellen verfügt (Dunn et al., 2002), auf deren Grundlage eine Vielzahl immunologischer Therapiestrategien zur Behandlung von Tumorerkrankungen entwickelt wurde.

Die **unspezifische Stimulation** des Immunsystems wird erfolgreich zur Stärkung gegen Infektionserkrankungen eingesetzt. Der abgeschwächte Mykobakterienstamm BCG (*Bacille-Calmette-Guérin*) und das *Corynebacterium parvum* sind potente Immunstimulatoren. Die unspezifische Stimulation des Immunsystems scheint eine präventive Wirkung bei Melanom- und Leukämieerkrankungen zu haben, die jedoch nur unzureichend belegt ist (Molife und Hancock, 2002).

Zytokine regulieren das Wachstum, die Aktivierung und die Differenzierung von Zellen. Das Zytokin Interleukin-2 (IL-2), das zytotoxische T-Zellen (CTL) und NK-Zellen stimuliert, wurde intensiv für die Behandlung von Tumorerkrankungen untersucht und erzielte bei immunogenen Tumorarten, wie Melanomen und Nierenzellkarzinomen, einige

Erfolge (Dutcher, 2002). Bei großen Tumoren zeigt IL-2 dagegen praktisch keine Wirkung. Außerdem führt eine andauernde systemische IL-2-Applikation zu Gefäßschäden (*endothelial leakage syndrome*) und einer verstärkten Extravasation der Lymphozyten. Neben IL-2 erzielten nur noch die Interferone IFN- α / β eine signifikante Wirkung gegen Tumore (Belardelli et al., 2002).

Tumorstabilisierungsstrategien versuchen, eine spezifische Aktivierung des Immunsystems zu erreichen. Da Tumorzellen aus körpereigenen Zellen hervorgehen, ist die Überwindung der immunologischen Selbsttoleranz ein kritischer Faktor und eine tumorspezifische Immunantwort kann mit Autoimmunreaktionen einhergehen (Overwijk et al., 1999). Vakzinierungsstrategien setzen auf die Verwendung von Tumorzellysaten, tumorspezifischen Proteinen oder Peptiden, Tumorzell-mRNA oder die cDNA von Tumorantigenen, gegen die eine spezifische Immunantwort erzeugt werden soll. Diese Ansätze werden in den meisten Fällen mit potenten Adjuvantien oder professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie den dendritischen Zellen (DCs), kombiniert, um eine effiziente Stimulation des Immunsystems zu erreichen (Bordignon et al., 1999; Renner et al., 2001). Obwohl der Tumorstabilisierung ein großes Potential für die Behandlung von Tumoren beigemessen wird, ist ihr Erfolg sehr von den individuellen Eigenschaften des Patienten, wie HLA-Typ, Krankheitsverlauf und immunologischer Status, abhängig. Außerdem entwickeln fortgeschrittene Tumore häufig Mechanismen, einer gegen sie gerichteten Immunantwort auszuweichen oder sie zu supprimieren (siehe 1.4).

Antikörper spielen eine wichtige Rolle in der Tumordiagnostik beim Aufspüren von Tumormarkern und Tumorzellen. Tumorspezifische Antikörper werden auch zur Tumorthherapie eingesetzt (Milenic et al., 2004; Silverman et al., 2004; von Mehren et al., 2003). Sie können über ihren konstanten Teil in Abhängigkeit von ihrem Isotyp andere immunologische Effektoren (z. B. Komplement, Immunzellen mit Fc-Rezeptoren) an die Tumorzellen binden. Trotzdem vermitteln Antikörper häufig nur eine geringe Antitumorstabilisierung, da sie schnell von der Oberfläche der Tumorzellen durch „*Capping*“, „*Shedding*“ oder Endozytose beseitigt werden. Die direkte Kopplung der Antikörper mit Effektoren, wie radioaktiven Isotopen, toxischen Molekülen (z. B. Chlorambucil, Ricin) oder Enzymen, die nichttoxische Vorstufen eines Chemotherapeutikums aktivieren, umgeht einen Teil dieser Probleme. Antikörper reichern sich jedoch nur sehr langsam in soliden Tumoren an, die meistens schwach und unvollständig vaskularisiert sind (verschlossene Kapillaren, arteriovenöse Anastomosen), einen erhöhten Innendruck (Turgor) besitzen und durch endotheliale Zellschichten vom Blut- und Lymphsystem isoliert sind. Antikörper wurden dagegen erfolgreich zur Behandlung von

Leukämien eingesetzt (Jurcic, 2000; Jurcic, 2001). Um die Bildung von Anti-Maus-Antikörpern (HAMA, *human anti-mouse antibodies*) zu vermeiden (Schwartz et al., 1993), werden hauptsächlich humane bzw. humanisierte Antikörper verwendet. Informationen zu rekombinanten Antikörpern sind im Abschnitt 1.6 angegeben.

1.2 Adoptive zelluläre Immuntherapie

1.2.1 Prinzip der adoptiven Immuntherapie

In den frühen 60iger Jahren entdeckte J. L. Gowans, daß die Entfernung der Lymphozyten aus Ratten zum Verlust ihrer Immunität führte, die durch Rücktransfer der Lymphozyten wiederhergestellt werden konnte. Seine Transferexperimente identifizierten die Lymphozyten als die wichtigsten Vermittler der Immunantwort und als die Träger des immunologischen Gedächtnisses (Gowans und Uhr, 1966). Außerdem wurde gezeigt, daß sich durch den adoptiven Transfer von Lymphozyten die Immunkompetenz eines Individuums auf andere übertragen läßt. Auf diesem Prinzip basiert die **adoptive zelluläre Immuntherapie**. Im Gegensatz zu den zellulären Vakzinierungsstrategien werden durch den adoptiven Transfer von Lymphozyten die immunologischen Effektoren und deren Spezifität übertragen und nicht erst im Patienten erzeugt. Der adoptive Transfer tumorspezifischer Lymphozyten wurde in Tiermodellen erfolgreich demonstriert (Hanson et al., 2000; Hu et al., 1993; Rosenstein et al., 1984). Die Bereitstellung einer ausreichenden Zahl tumorspezifischer Lymphozyten für den Menschen ist dagegen immer noch äußerst kompliziert.

1.2.2 Adoptive Immuntherapie mit autologen LAK-Zellen und TILs

Autologe Lymphozyten wurden intensiv auf ihren Einsatz für eine adoptive Immuntherapie untersucht. Durch Aktivierung peripherer Blutlymphozyten (PBL) mit hohen IL-2-Konzentrationen werden **Lymphokin-aktivierte-Killer-(LAK)-Zellen** erzeugt, die *in vitro* ein breites Spektrum an Tumorzellen lysieren. Ihre Aktivierung und Wirkung ist jedoch *in vivo* zeitlich begrenzt. Die gleichzeitige Applikation von IL-2 verbessert die Effizienz der LAK-Zelltherapie. Trotzdem führt ihre mangelnde Spezifität nur zu einer geringen Anti-tumorwirkung (Bordignon et al., 1999). Möglicherweise wirken LAK-Zellen durch Zerstörung von DCs sogar einer adaptiven Tumormunität entgegen (Parajuli et al., 1999).

In vielen soliden Tumoren und tumornahen Lymphknoten werden **tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs)** nachgewiesen. Die TILs enthalten häufig tumorspezifische T-Zellen mit eingeschränkten Effektorfunktionen, die sich *ex vivo* durch Stimulation mit IL-2 wieder-

herstellen lassen. Die Präparation von TILs ist aufwendig und scheitert oft an den mangelnden Tumorbiopsien (Topalian et al., 1989) oder der Aufbereitung des Patientenmaterials (Lewko et al., 2000). Autologe tumorspezifische T-Zellen konnten durchgehend nur aus Melanompatienten isoliert werden. TILs zeigten in Kombination mit IL-2 eine therapeutische Wirkung bei metastatischen Melanomen (Aebersold et al., 1991; Rosenberg et al., 1994; Yannelli et al., 1996) und Nierenzellkarzinomen (Bordignon et al., 1999). Für die *ex-vivo*-Expansion von LAK-Zellen und TILs wurden spezielle Bioreaktoren entwickelt (Knazek et al., 1990; Malone et al., 2001).

1.2.3 In-vitro-Sensitivierung von autologen T-Zellen

Die *in-vitro*-„Sensitivierung“ (wörtlich: „Empfindlichmachung“) von T-Zellen gegen Tumorantigene wurde in Tiermodellen demonstriert (Lipshy et al., 1997). Humane zytotoxische T-Zellen (CTL) konnten mit EBV-immortalisierten autologen B-Zellen *in vitro* stimuliert und präventiv gegen EBV-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen nach Knochenmarktransplantationen eingesetzt werden (Rooney et al., 1998; Rooney et al., 1995). Naive humane T-Zellen lassen sich dagegen nicht effizient gegen Tumorantigene *in vitro* aktivieren, da die Häufigkeit tumorspezifischer T-Zellen (*precursor frequency*) im Blut extrem gering ist und Tumorantigene im Gegensatz zu viralen Antigenen nur eine geringe Immunogenität aufweisen. Bei der Expansion von melanomspezifischen TILs (1.2.2) wurden *in-vitro*-Sensitivierungsstrategien zur Erhaltung ihrer Antigenspezifität eingesetzt (Leong et al., 1995).

1.2.4 Genmodifikation von Lymphozyten zur Verbesserung ihrer Erkennungs- und Effektoreigenschaften

Durch genetische Manipulation wurde versucht, die Effizienz von autologen T-Zellen zu verbessern. Der Gentransfer von Zytokinen in TILs (Hwu et al., 1993b) kann zur Steigerung ihrer Effektoreigenschaften führen. Einige Zytokine, wie GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) und TNF- α (*tumor necrosis factor α*), förderten jedoch das Wachstum einiger Tumorarten *in vivo* (Bordignon et al., 1999). Der Gentransfer von TNF- α in T-Zellen führte außerdem zu deren Apoptose (Ebert et al., 1997).

Die Entwicklung rekombinanter T-Zellrezeptor-(TCR-)Genkonstrukte (Calogero et al., 2000; Chung et al., 1994; Eshhar, 1997; Gross et al., 1989) und effizienter retroviraler Gentransfersysteme für humane T-Zellen (Engels et al., 2003; Farson et al., 1999; Finer et al., 1994; Uckert et al., 1998; Weijtens et al., 1998a) könnte die Einschränkungen der LAK- und TIL-Therapien überwinden, da auf diese Weise in kurzer Zeit große Mengen an tumorspezifischen T-Zellen generiert werden können. Das *Targeting* von humanen T-Zellen durch

Transfektion mit rekombinanten TCR-Genen wurde erfolgreich gegen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen *in vitro* (Daly et al., 2000; Hombach et al., 2000b; Hwu et al., 1993a; Patel et al., 1999; Ren Heidenreich et al., 2000; Weijtens et al., 1998a) und *in vivo* (Haynes et al., 2002b; Hwu et al., 1995; McGuinness et al., 1999; Moritz et al., 1994; Roessig et al., 2002) demonstriert (siehe Abschnitt 1.7). Neben der Transfektionseffizienz spielt auch die Aktivierung und Kostimulation der transfizierten T-Zellen eine wichtige Rolle für ihre Antitumorwirkung (Brocker, 2000; Eshhar et al., 2001; Hwu et al., 1995; Ren Heidenreich et al., 2000).

Die klinische Wirksamkeit und Sicherheit von rezeptorgenmodifizierten T-Zellen erfordert noch umfangreiche Studien, da nur wenige langfristige Daten über ihr *in-vivo*-Verhalten im Menschen vorliegen (Walker et al., 2000b). Die retrovirale Modifikation selbst scheint keine negativen Veränderungen in den T-Zellen zu bewirken (Rosenberg, 1991; Rosenberg et al., 1990). In einem syngen BALB/c-Mausmodell wurde nach dem adoptiven Transfer keine „humorale“ Immunantwort gegenüber den genmodifizierten T-Zellen beobachtet (Altenschmidt et al., 1997). Im Gegensatz dazu wurden autologe humane T-Zellen nach dem retroviralen Gentransfer eines HIV-spezifischen Rezeptors durch rezeptorspezifische CTL eliminiert (Riddell et al., 1996). Der häufig verwendete retrovirale Vektor LXS_N sensibilisierte die genmodifizierten T-Zellen gegenüber autologen Natürlichen Killer-(NK)-Zellen und antigenspezifischen CTL, verursacht durch die Expression des Selektionsmarkers *neo* (Bordignon et al., 1999; Liberatore et al., 1999). Viele Beobachtungen legen außerdem eine Veränderung der autologen T-Zellen bei längerer *ex-vivo*-Kultivierung nahe, die sie nach Reinfusion in den Patienten als „fremd“ erscheinen lassen. Die Risiken verbunden mit dem onkogenen Restpotential von Retroviren (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Williams und Baum, 2003) scheinen durch Optimierungen an den retroviralen LTRs (*long terminal repeats*) beherrschbar zu sein. Alternativ können primäre T-Zellen auch über „nackte“ DNA, d. h. mit Plasmidvektoren, genetisch modifiziert werden (Jensen et al., 2000; Jensen et al., 2003).

1.2.5 Adoptive Immuntherapie mit autologen NK-Zellen

Eine weitere Quelle zytotoxischer Effektorzellen für eine adoptive Immuntherapie sind NK-Zellen (siehe 1.5). Sie lysieren ein breites Spektrum an virusinfizierten Zellen und Tumorzellen (Cervantes et al., 1996; Uharek et al., 1996; Vujanovic et al., 1995). NK-Zellen lassen sich im Gegensatz zu tumorspezifischen T-Zellen aus den meisten Menschen in ausreichender Menge isolieren. Trotzdem wurden bisher nur wenige klinische Studien mit autologen NK-Zellen durchgeführt (Lister et al., 1995). NK-Zellen scheinen eine wichtige Rolle bei der

Kontrolle akuter myeloischer Leukämien (AML) zu spielen (Lowdell et al., 2002; Pross und Lotzova, 1993). Aufgrund ihrer geringeren Tumorspezifität gelten jedoch für die NK-Zellen ähnliche Einschränkungen wie für die LAK-Zelltherapie (1.2.2). Die retrovirale Genmodifikation von NK-Zellen mit tumorspezifischen Rezeptoren ist aufgrund ihres geringen Proliferationspotentials nur begrenzt möglich. Außerdem scheinen retroviral transfizierte NK-Zellen eingeschränkte Effektorfunktionen aufzuweisen (Naylor et al., 2001).

1.2.6 Probleme autologer Strategien einer adoptiven Immuntherapie

Der Herstellungsprozeß autologer tumorspezifischer Lymphozyten ist für eine klinische Anwendung kritisch. Da viele Patienten aufgrund ihrer Erkrankung und der vorangegangenen Therapien immunsupprimiert sind, läßt sich die Erzeugung einer ausreichenden Menge funktioneller tumorspezifischer Lymphozyten weder in qualitativer und quantitativer noch in zeitlicher Hinsicht gewährleisten. Außerdem bedeutet die Entnahme von Lymphozyten einen zusätzlichen Streß für den abwehrgeschwächten Tumorpatienten. Ein weiteres Problem kann die Kontamination des Patientenblutes mit zirkulierenden Tumorzellen sein, die nach Reinfusion zu einem Rückfall der Tumorerkrankung führen könnte und als eine Ursache für die hohe Tumorrezidivrate autologer hämatopoetischer Transplantationen diskutiert wird.

1.2.7 Allogene Spenderlymphozyteninfusionen

Die Verwendung allogener Spenderlymphozyten könnte Vorteile gegenüber autologen Strategien bringen, da ihre Herstellung unabhängig vom Patienten erfolgt. Die Abstoßung allogener Lymphozyten beschränkt ihren Einsatz selbst bei hoher Gewebekompatibilität auf Patienten, deren Immunsystem supprimiert ist. Leukämiepatienten erhalten nach Chemotherapie (z. B. mit hochdosierten Alkylantien) oder Strahlentherapie (Ganzkörperbestrahlung mit 10 – 14 Gy) eine Knochenmark- oder Stammzelltransplantation (SCT, *stem cell transplantation*). Dabei wurde festgestellt, daß Patienten nach einer allogenen SCT eine bessere Prognose besaßen als Patienten nach einer autologen SCT. Der antileukämische Effekt (GvL, *graft versus leukemia*) wurde auf allogene Lymphozyten im Transplantat zurückgeführt (Horowitz et al., 1990; Jiang et al., 1991) und beruht wahrscheinlich auf Unterschieden in den Gewebekompatibilitätsfaktoren. Allogene T-Zellen verursachen jedoch auch die gegen den Empfänger gerichtete *Graft-versus-Host*-Erkrankung (GvHD), die zum Tode des Patienten führen kann (Giralt und Kolb, 1996; Szydlo et al., 1997). Die genetische Modifikation der allogenen Donorlymphozyten mit Suizidgenen (z. B. Thymidinkinase-Gen) kann die GvHD nur geringfügig mildern (Bordignon et al., 1999).

Die Infusion von NK-Zellen eines allogenen Spenders bei einer allogenen SCT bewirkt ebenfalls einen GvL-Effekt und wirkt der Transplantatabstoßung durch Eliminierung restlicher Immunzellen des Empfängers entgegen. Im Gegensatz zu allogenen T-Zellen verursachen allogene NK-Zellen jedoch keine GvHD (Ruggeri et al., 2001; Ruggeri et al., 2002). Allogene T-Zellen, die ihr Peptid-Antigen im Kontext mehrerer unterschiedlicher MHC-Moleküle erkennen (Stauss, 1999), können die Toleranz gegenüber Tumorantigenen überwinden (Stanislawski et al., 2001) und lösen ebenfalls keine GvHD aus (Gao et al., 1999).

1.2.8 Adoptive Immuntherapie mit tumorspezifischen Effektorzelllinien

Die Verwendung primärer Lymphozyten erfordert individuelle Therapieansätze unabhängig davon, ob sie autologer oder allogener Herkunft sind. Der individuelle Herstellungsprozeß der tumorspezifischen Lymphozyten ist zeit- und kostenaufwendig und muß für jeden Patienten erneut durchgeführt werden. Allogene Effektorzelllinien mit Antitumoreigenschaften könnten deshalb eine Alternative darstellen. Effektorzelllinien sind unbegrenzt verfügbar und könnten zur Behandlung einer großen Patientengruppe bei bestimmten Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Ihre patientenunabhängige Herstellung kann im großen Maßstab erfolgen, ermöglicht einen hohen Standardisierungsgrad und verringert den technischen, zeitlichen und finanziellen Aufwand erheblich. Auf Basis von Effektorzelllinien könnte eine breite klinische Anwendung einer tumorspezifischen adoptiven Immuntherapie realisiert werden, die mit dem Einsatz immunopharmazeutischer Medikamente, wie Antikörpern oder Zytokinen, vergleichbar ist.

Allogene zytotoxische Zelllinien mit Antitumoreigenschaften wurden im Rahmen präklinischer und klinischer Studien auf ihre Sicherheit untersucht. Die T-Zelllinie TALL-104 (T-ALL, *acute lymphoblastic leukemia*), die Tumorzelllinien MHC-unabhängig lysiert, wurde in Mäusen (Cesano et al., 1996a; Cesano et al., 1996c; Cesano et al., 1997b), Hunden (Cesano et al., 1996b; Visonneau et al., 1999) und in Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs eingesetzt (Visonneau et al., 2000). Die TALL-104-Zellen wurden von den Tumorpatienten gut toleriert. Es wurde keine zelluläre Immunisierung gegenüber der allogenen Effektorzelllinie beobachtet. Die humane NK-Zelllinie NK92 wird gegenwärtig auf ihre Sicherheit und Wirksamkeit bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren getestet (Tonn et al., 2001). Da nur wenige humane tumorspezifische Effektorzelllinien etabliert sind, könnte durch die genetische Modifikation dieser Zelllinien das Spektrum an behandelbaren Tumoren erweitert werden. Die NK-Zelllinie NK92 wurde mit einem ErbB2-spezifischen Rezeptorgenkonstrukt retroviral transfiziert und zeigte eine spezifische Zytotoxizität gegenüber ErbB2⁺ Tumorzelllinien (Uherek et al., 2002).

1.3 Tumorassoziierte Antigene

1.3.1 Einteilung der Tumorantigene

Die Prozesse während der Tumorentwicklung führen zu einer veränderten Antigenexpression in den Tumorzellen, die ein potentielles Ziel für das Immunsystem oder eine Immuntherapie darstellt. Die Unterteilung **tumorassoziiierter Antigene (TAAs)** kann nach unterschiedlichen Gesichtspunkten erfolgen und darf nicht als strikt angesehen werden.

Die **Cancer-Testis-(CT)-Antigene** sind in ihrer Expression auf Tumor- und Testisgewebe, gelegentlich die Plazenta, beschränkt. In diese Gruppe fallen die MAGE- (*melanocyte antigen*), BAGE- (*B antigen*) und GAGE- (*G antigen*) Proteinfamilien sowie NY-ESO-1 und die in jüngerer Zeit klonierten HAGE- (*helicose antigens*), SAGE- (*sarcoma antigens*), LAGE- (*L antigens*) und CT-Antigene. Andere relativ **weitverbreitete Tumorantigene** sind in verschiedenen gesunden Geweben vorhanden, sind aber in den Tumorzellen häufig überexprimiert. Zu dieser Gruppe gehören z. B. CAMEL (*CTL-recognized antigen on melanoma*), HER2/Neu (*human epithelial receptor 2 / neurological*) oder Mucin-1. Eine weitere Gruppe sind die **onkofetalen Antigene**, die auf der Reaktivierung embryonaler Gene beruhen und in den meisten adulten Geweben inaktiv sind, z. B. Alphafetoprotein (AFP, *fetales α -Globulin*). **Differenzierungsantigene** gehen häufig auf das Ursprungsgewebe der Tumorzellen zurück und müssen keine Bedeutung für die Onkogenese haben. Zu dieser TAA-Familie gehören z. B. die Melanozytenantigene MART-1 (*melanocyte antigen recognized by T cells*, auch Melan-A), gp100, Tyrosinase und TRP-1/-2 (*tyrosinase-related proteins*). Die **tumor-spezifischen Transplantationsantigene (TSTAs)** beruhen auf somatischen Genmutationen und sind tumorspezifisch. Sie sind aufgrund ihrer höheren Immunogenität für die Abstoßung von Tumortransplantaten in Mäusen verantwortlich.

Die meisten TAAs besitzen keine oder nur eine sehr geringe Immunogenität. Trotzdem können spezifische T-Zellen gegen die TAAs gebildet werden. T-Zellen erkennen Peptid-epitope im Kontext bestimmter MHC-Moleküle. Deshalb lassen sich Tumorantigene auch hinsichtlich **MHC-Klasse-I-** und **MHC-Klasse-II-Restriktion** der T-Zellerkennung einteilen (Renkvist et al., 2001). Eine Datenbank von T-Zellepitopen mit integrierten Voraussagealgorithmen ist unter <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com> verfügbar.

Gegen eine Vielzahl von TAAs wurden spezifische Antikörper isoliert, die ein wichtiges Werkzeug für die Diagnose und Therapie sind. Die **SEREX-Methode** (*serological identification of antigens by recombinant expression cloning*) (Sahin et al., 1997) erlaubt die Identifikation unbekannter TAAs durch die Isolation von tumorspezifischen rekombinanten

Antikörperfragmenten aus dem Repertoire der Immunglobulin-Gene eines Tumorpatienten (Chen et al., 1997; Scanlan et al., 1998; Tureci et al., 1996; Tureci et al., 1999). Eine Datenbank der SEREX-Daten ist unter <http://www.licr.org/SEREX.html> zugänglich.

Mit Antikörpern und Lektinen lassen sich **tumorassoziierte Glykosylierungen** nachweisen. Zu den tumorassoziierten Kohlenhydratstrukturen gehören die Lewis-Antigene (Nakagoe et al., 2001), die auch auf vielen Immunzellen vorkommen, und Glykane mit terminalen β 1-Galaktosylresten, wie das Thomsen-Friedenreich-Antigen (Campbell et al., 1995; Chung et al., 1996; Reese und Chow, 1992; Yeatman et al., 1989). Ihnen wird eine große Bedeutung bei der Organlokalisierung von Tumormetastasen beigemessen (Cao et al., 1995; Cornil et al., 1990; Shigeoka et al., 1999).

1.3.2 Das karzinoembryonale Antigen (CEA)

CEA (CEACAM5, CD66e) ist ein lange bekanntes Tumorantigen und wurde ursprünglich von Gold und Friedman um 1965 beschrieben (Thomson et al., 1969). Es gehört zu einer Familie von Adhäsionsmolekülen, die als CEACAM- (*CEA cell adhesion molecules*) oder CD66-Familie bezeichnet wird (Beauchemin et al., 1999; Hammarstrom, 1999). Diese Proteinfamilie gehört zur Immunglobulinsuperfamilie (IgSF) und umfaßt 8 Gene und 3 Pseudogene, die auf Chromosom 19q im LRC (*leukocyte receptor cluster*) genetisch lokalisiert sind (Khan et al., 1992). 50 – 60% des Molekulargewichts des 180 kDa-Glykoproteins CEA machen N-verknüpfte multiantennäre Glykosylierungen aus. CEA ist auf der Plasmamembran über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) mit Phospholipiden verknüpft. Die GPI-Verankerung wird über eine C-terminale Signalsequenz vermittelt (Takami et al., 1988). Die kontroversen Ergebnisse der mRNA- und Protein-Level deuten eine Regulation der CEA-Expression auf posttranskriptionaler Ebene an (Boucher et al., 1989). CEA wird im adulten Menschen als Bestandteil der Glykokalyx auf der apikalen Seite reifender und ausdifferenzierter Enterozyten der Darmzotten exprimiert (Frangmyr et al., 1999; Kuroki et al., 1988). Die Freisetzung von CEA in das Darmlumen erfolgt entweder in lipidgebundener Form über die Vesikulation der Mikrovilli oder in gelöster Form über die GPI-spezifische Phospholipase C (Matsuoka et al., 1991). CEA hat eine Bedeutung bei der Kotbildung und beim Schutz vor pathogenen Darmbakterien.

CEA wird häufig auf epithelialen Tumoren, insbesondere Adenokarzinomen des Verdauungstraktes (Kinugasa et al., 1998; Tachibana et al., 1998), aber auch der Brust, der Bauchspeicheldrüse und der Lunge nachgewiesen. CEA dient als ein empfindlicher, jedoch nicht als spezifischer diagnostischer Tumormarker. Patienten mit Kolonkarzinomen weisen häufig CEA-Serumkonzentrationen von 1 μ g/mL, in seltenen Fällen von 4 μ g/mL, auf

(Moertel et al., 1986). Trotzdem ist ein individueller Abgleich des Basiswertes für jeden Patienten erforderlich, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen.

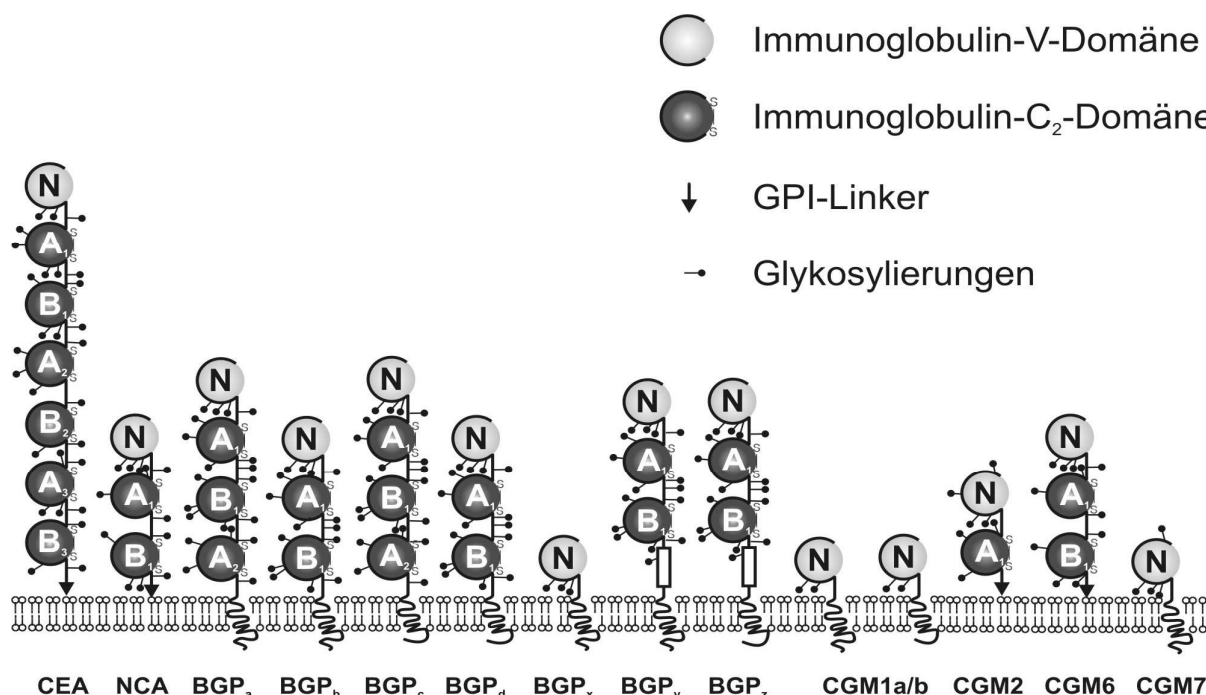


Abbildung 1 - Die CEACAM-Familie

Die Mitglieder der CEACAM-Familie besitzen homologe Proteindomänen und sind stark glykosyliert. Über die N-Domänen kann eine homotypische Aggregation der CEACAMs erfolgen. Einige CEACAMs verfügen über eine große Zahl von Spleißvarianten (modifiziert nach Hammarstrom, 1999).

CEA-spezifische Antikörper zeigen häufig eine Kreuzreaktivität mit mehreren Mitgliedern der CEACAM-Familie (CD66abce, CD66acde, CD66ace, CD66ae, CD66ce, CD66de) aufgrund ihrer homologen Domänen (Nagel et al., 1993). CEA vermittelt über seine N-terminale IgV-ähnliche N-Domäne eine homotypische interzelluläre Adhäsion, die eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielen könnte. Tumorzellaggregate haben wahrscheinlich eine größere Chance, sich vom Primärtumor zu lösen, im Blutkreislauf zu überleben und sich in anderen Geweben zu verankern, um dort Metastasen zu etablieren, als einzelne Tumorzellen (Levin und Griffin, 1991). Obwohl Mäuse kein CEA exprimieren, bildeten sich in transgenen Mäusen, bei denen das SV40-T-Antigen unter Einfluß des humanen CEA-Promoters stand, multifokale Tumore am Pylorus des Magens. Diese Tumore zeigten ein invasives Verhalten vergleichbar mit humanen Magenkarzinomen (Thompson et al., 2000). Die Kreuzung mit CEA-transgenen Mäusen führte zu doppelt transgenen Nachkommen, deren Magentumore CEA exprimierten (Thompson et al., 1997). Prado *et al.* (Prado et al., 1995) zeigten eine inverse Korrelation der CEA-Expression und NK-Zellsensibilität von Tumoren, räumten aber auch weitere Eigenschaften als Ursache ein. Lösliches CEA

inhibiert die LAK-Zellaktivität und könnte als immunsupprimierender Faktor wirken (Rivoltini et al., 1992). Eine direkte Bindung von CEA an die LAK-Zellen konnte aber nicht gezeigt werden.

1.3.3 CD33, ein Marker akuter myeloischer Leukämien

CD33 (Siglec-3) gehört zur Sialoadhesinfamilie, einer Familie Sialinsäure-bindender Ig-ähnlicher Lektine (Freeman et al., 1995), welche CD22 (Siglec-2) und p75AIRM (Siglec-7) einschließt. Diese Gene wurden zusammen mit NKG7 benachbart zur CD66-Familie auf Chromosomen 19q im LRC gefunden. CD33 ist ein Differenzierungsmarker auf myeloischen und lymphoiden Vorläuferzellen und geht bei der weiteren Differenzierung verloren. Bei etwa 80% der akuten myeloischen Leukämien (AML) und 20% der akuten lymphatischen Leukämien der B-Zellreihe (B-ALL) bleibt CD33 erhalten. Siglecs sind in die Hämatopoese involviert. Während CD22 eine wichtige Rolle bei der B-Zellentwicklung spielt, sind CD33 und p75/AIRM an regulatorischen Prozessen der Myelopoese beteiligt. „Crosslinking“ von CD33 mit Antikörpern verhindert die Generation von DCs aus Monozyten (Ferlazzo et al., 2000). Antikörper gegen CD33 und p75/AIRM inhibieren chronische myeloische Leukämiezellen aber auch hämatopoetische Vorläuferzellen (Mingari et al., 2001; Vitale et al., 1999). CD33-spezifische Antikörper wurden erfolgreich zur Therapie myeloischer Leukämien eingesetzt (Caron et al., 1998; Caron et al., 1994; Jurcic, 2000; Jurcic et al., 2002; Kossman et al., 1999; Matthews, 1998).

1.4 Immunologische „Escape-Mechanismen“ von Tumoren

1.4.1 Toleranzinduktion durch den Tumor

Trotz veränderter Antigenexpression der Tumorzellen bleibt in den meisten Patienten eine effektive Immunantwort gegen den Tumor aus. Eine Ursache könnte das „*sneaking through*“-Phänomen sein. Die nichtimmunogenen frühen Phasen und die schleichenden Veränderungen während der Tumorentwicklung werden vom Immunsystem nicht oder nicht rechtzeitig erkannt, wodurch der Tumor Mechanismen ausbilden kann, eine tumorspezifische Immunantwort zu unterlaufen oder aktiv zu hemmen (Finke et al., 1999). Diese „Immun-Escape-Mechanismen“ entstehen in einem selektiven Prozeß. Vermutlich führt schon die Konkurrenz der Tumorzellen untereinander um abnehmende Ressourcen zur Sekretion zytotoxischer Faktoren. Weitere selektive Drücke werden durch unvollständige Immunreaktionen gegen den Tumor ausgeübt. Mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie der *Colitis ulcerosa*,

ist ein erhöhtes Darmkrebsrisiko assoziiert. Das frühe Auftreten von *TP53*-Mutationen bei UCACRCs (*ulcerative colitis-associated colorectal carcinomas*) könnte aus dem apoptotischen Streß durch inflammatorische Zytokine resultieren. Tumore blockieren außerdem in den frühen Phasen und beim Übergang zu invasiven Stadien entzündliche Prozesse, die als Alarmsignal zur Initiation der Immunantwort dienen, und verschieben damit das Gleichgewicht des Immunsystems in Richtung Toleranzinduktion (Pardoll, 2003).

1.4.2 Veränderte MHC-Expression auf Tumoren

Viele fortgeschrittene Tumore regulieren ihre MHC-Moleküle oder bestimmte MHC-Allele herunter, um einer T-Zellantwort auszuweichen (Cordon Cardo et al., 1991; Garcia-Lora et al., 2003; Garrido et al., 1995). Die Antigenpräsentation kann auch durch TAP-Defekte (*transporter associated with antigen processing*) blockiert sein (Seliger et al., 1997). Da das Fehlen klassischer MHC-Ia-Haplotypen durch NK-Zellen erkannt wird, schützen sich viele Tumorzellen durch Expression von HLA-C und nichtklassischen MHC-Ib-Molekülen (HLA-G, -E). Dieser Mechanismus dient auch den Trophoblastzellen der Plazenta als Schutz und Barriere vor den mütterlichen NK-Zellen (Biassoni et al., 1999; King et al., 2000).

1.4.3 Tumorinduzierte Immunmodulation und -suppression

Das Mikromilieu am und im Tumor spielt eine bedeutende Rolle beim Unterdrücken einer tumorgerichteten Immunabwehr. IL-10 kann die MHC- und TAP-Expression reduzieren (Matsuda et al., 1994; Salazar-Onfray et al., 1997), und TGF- β (*tumor growth factor β*) hemmt die IL-2 und IFN- γ -Produktion, zwei wichtigen Mediatoren von CTL- und NK-Zellantworten. In vielen Tumorpatienten wurden funktionelle Defizite in der Signaltransduktion der T-Zellen festgestellt, die die CD3 ζ -Kette, die Protein-Tyrosin-Kinasen p56^{lck} und p59^{fyn} sowie NF- κ B p65 betrafen (Bukowski et al., 1998; Correa et al., 1997; Mizoguchi et al., 1992; Whiteside, 1999). Die CD3 ζ -Kette wird vermutlich proteolytisch durch die Caspasen 3 und 7 abgebaut, da keine Änderung des mRNA-Levels festgestellt wurde. Die ζ -Kette wird auch durch reaktive Sauerstoffspezies der Makrophagen oder eine chronische Antigenstimulation ohne Kostimulation herunterreguliert und oftmals durch die γ -Kette ersetzt. Die CD28-Kostimulation ist davon nicht betroffen (Finke et al., 1999). Viele Mammakarzinome bewirken eine Inaktivierung von NF- κ B und eine veränderte Zytokinproduktion der TILs. Die erhöhte Sekretion von IL-10 hemmt die für eine tumorspezifische CTL-Antwort notwendige Th1-Antwort (Rabinowich et al., 1996). Eine lange Exposition mit Th2-Zytokinen (IL-4, IL-6 und IL-10) führt zum Verlust der Th1-Population in Mäusen mit Nierenzellkarzinomen (Ghosh et al., 1995). Der Anteil apoptotischer T-Zellen ist in Tumor-

infiltraten deutlich erhöht (Reichert et al., 1998). Einige Kolon-, Nieren- und Ovarialkarzinome exprimieren außerdem Fas-Ligand (FasL), das die Apoptose *fas*⁺ Lymphozyten auslösen könnte (Gastman et al., 1999; Rabinowich et al., 1998; Uzzo et al., 1999). Obwohl die Expression von FasL keinen Schutz vor einer CTL-Antwort bietet, da spezifisch aktivierte CTL unempfindlich gegenüber der *fas*-vermittelten Apoptose sind, werden möglicherweise tumorspezifische naive T-Zellen eliminiert, bevor sie spezifisch aktiviert werden konnten.

Die immunsupprimierende Wirkung von Tumoren korreliert mit dem Tumolvolumen und der Länge der Exposition. Die Signaltransduktionsdefekte von TILs können nach ihrer Isolation *ex vivo* durch IL-2 beseitigt werden. Die chirurgische Entfernung von Tumoren oder die Reduktion der Tumormasse führen häufig zur Wiederherstellung der normalen NF-κB-Aktivität und CD3 ζ-Expression in den T-Zellen. Der Einsatz immunologischer Therapien erfordert die Berücksichtigung der „Immun-Escape“-Mechanismen von Tumorzellen und der tumorassoziierten Immunsuppression (Gratama et al., 1999).

1.5 Natürliche Killerzellen

1.5.1 Allgemeine Eigenschaften von NK-Zellen

NK-Zellen werden morphologisch zu den großen granulären Lymphozyten (LGL, *large granular lymphocytes*) gezählt und machen 10 – 15% der peripheren Blutlymphozyten aus. Sie werden außerdem in der Milz, im Thymus, in den Lymphknoten, in der *lamina propria* und als gewebspezifische Populationen, z. B. in der Leber (Luo et al., 1999), nachgewiesen. Anfänglich wurden NK-Zellen als „Nullzellen“ oder „*third population cells*“ bezeichnet, da ihnen keine spezifischen Immunmarker zugeordnet werden konnten. Die als „Natürliche Killer“-Aktivität bezeichnete von TCR⁻/CD3⁻ CD56⁺ CD16⁺ LGLs „spontan“ vermittelte zelluläre Zytotoxizität gegenüber virusinfizierten Zellen und Tumorzellen führte schließlich zur Bezeichnung als „Natürliche Killerzellen“ (Herberman et al., 1976).

NK-Zellen und T-Zellen sind eng miteinander verwandt. Sie entwickeln sich aus einem gemeinsamen lymphoiden Knochenmarkvorläufer (Lanier et al., 1992). Bestimmte T-Zellpopulationen weisen NK-Zelleigenschaften auf und werden als NKT-Zellen bezeichnet (Brutkiewicz und Sriram, 2002). Im Gegensatz zu den T-Zellen differenzieren sich NK-Zellen unabhängig vom Thymus. Obwohl sie keine individualspezifischen Antigenrezeptoren exprimieren, stellen NK-Zellen eine sehr heterogene Lymphozytengruppe dar. NK-Zellen wirken komplementär zu den T-Zellen, indem sie MHC-I Zellen lysieren, und synergistisch, indem sie die Th1-Antwort und die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen fördern (Kelly et al.,

2002). Die NK-Zellaktivität erreicht 1 – 3 Tage nach einer Erstinfektion ihr Maximum, während die primäre CTL-Antwort erst nach 7 – 9 Tagen erfolgt. NK-Zellen bilden im Gegensatz zu T-Zellen kein „immunologisches Gedächtnis“.

Die Freisetzung von Interferonen durch virusinfizierte Zellen führt zur Aktivierung der NK-Zellen. Die NK-Zellen reagieren außerdem auf die Herunterregulation von MHC-I-Molekülen und die Expression von Stressproteinen oder bestimmten viralen Komponenten auf Tumorzellen und virusinfizierten Zellen. NK-Zellen sekretieren daraufhin IFN- γ , GM-CSF, und TNF- α . Diese inflammatorischen Zytokine aktivieren Makrophagen, die IL-12 sekretieren. IL-12 stimuliert zusammen mit IFN- γ die Th1-Antwort und damit die Bildung antigenspezifischer CTL. IFN- γ bewirkt zusätzlich die Hochregulation der MHC-Expression auf virusinfizierten Zellen, eine wichtige Voraussetzung für die T-Zellerkennung. NK-Zellen interagieren auch mit den DCs, deren Bedeutung aber nicht völlig geklärt ist (Chiesa et al., 2003; Moretta et al., 2003). CD16⁺ NK-Zellen sind wichtige Effektoren für Antikörper (beim Menschen: IgG1 und IgG3) und die Vermittler der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC).

NK-Zellen werden durch Th1-Zytokine (IL-2, IL-12 und IFN- γ) aktiviert, wodurch Adhäsionsmoleküle und einige aktivatorische Rezeptoren hochreguliert werden. Das Zusammenwirken von IL-12 mit TNF- α , IL-15 oder IL-18 fördert die NK-Zellaktivität. Inflammatorische Chemokine, wie MIP- α/β (*macrophage inflammatory protein*) erhöhen ihre Migrationseigenschaften (Taub et al., 1995). In Gegenwart hoher IL-2-Konzentrationen (1000 IE/mL) entwickeln viele NK-Zellen einen adhärenenten Phänotyp. Die adhärenenten NK-Zellen zeichnen sich durch ein erhöhtes Migrationsverhalten und Effektorpotential gegenüber Tumorzellen und Metastasen aus (Vujanovic et al., 1995). Die IL-2-Aktivierung kann *in vitro* einige Wochen erhalten werden, führt aber zu einer veränderten Expression der Adhäsionsmoleküle und möglicherweise zu eingeschränkten migratorischen Fähigkeiten und Effektoreigenschaften (Maenpaa et al., 1993).

1.5.2 Erkennungsmechanismen der NK-Zellen

Die Zytotoxizität der NK-Zellen wird durch **aktivatorische** und **inhibitorische NK-Zell-rezeptoren** (1.5.3) sowie durch **Adhäsionsmoleküle** (1.5.4) reguliert (Bakker et al., 2000; Moretta et al., 1995; Moretta et al., 2000b). Die von Kärre und Ljunggren vorgestellte „**missing-self**“-Hypothese (Ljunggren und Kärre, 1990) postulierte, daß das Fehlen klassischer MHC-Ia-Moleküle zu einer NK-Zellattacke führt, da NK-Zellen inhibitorische MHC-Rezeptoren (Tabelle 1) exprimieren. Umgekehrt schützen MHC-Klasse-Ia-Moleküle

als „Selbst“-Moleküle die Körperzellen vor einer NK-Zellattacke ("express yourself or die", Karre, 1995). Auf NK-Zellklonen wird nur selten mehr als ein inhibitorischer NK-Zellrezeptor für MHC-Ia-Moleküle nachgewiesen, wodurch schon das Fehlen eines MHC-Ia-Allels durch eine bestimmte NK-Zellpopulation erkannt wird. Die „*missing-self*“-These kann jedoch nicht die Erkennung allogener MHC-Moleküle (*allorecognition*) und die Hybridresistenz allogener Knochenmarktransplantate vollständig erklären (Bennett et al., 1995; George et al., 1997). Die Entdeckung aktivatorischer NK-Rezeptoren für MHC-Klasse-Ia-Moleküle (Tabelle 2) führte zum „**On-Off**“-Modell (Raulet und Held, 1995), der Aktivierung oder Hemmung der NK-Zellen in Abhängigkeit davon, ob die MHC-Ia-Liganden auf den Zielzellen durch aktivatorische oder inhibitorische NK-Zellrezeptoren erkannt werden. Die gleichzeitige Expression inhibitorischer und aktivatorischer Rezeptoren für denselben MHC-Typ erfordert jedoch komplexere Modelle. Gegenwärtig wird von einem Gleichgewicht inhibitorischer und aktivatorischer Signale in den NK-Zellen ausgegangen, das durch eine verringerte oder veränderte MHC-Ia-Expression auf den Zielzellen gestört wird. Die komplexen Interaktionen von NK- und Zielzellen schließen außerdem Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren für nichtklassische MHC-Ib-Moleküle, virale Proteine und Streßproteine ein, die erst in ihrer Summe zur Aktivierung der NK-Zellzytotoxizität führen (siehe 1.5.3 - 1.5.6).

1.5.3 NK-Zellrezeptoren

Es werden zwei große NK-Zellrezeptorfamilien unterschieden (Moretta et al., 2000b), zu denen inhibitorische Rezeptoren (**Tabelle 1**) als auch aktivatorische Rezeptoren (Tabelle 2) gehören. Die **KIRs** (*killer cell Ig-like receptors*) gehören zur Immunglobulinsuperfamilie und sind im LCR-Locus (*leukocyte Ig-like receptor*) auf dem humanen Chromosom 19q13.4 lokalisiert. Sie erkennen MHC-Klasse-Ia-Moleküle (HLA-A/B/C) und nichtklassische MHC-Ib-Moleküle, wie HLA-G (Lopez Botet et al., 2000). Einige inhibitorische KIRs besitzen aktivatorische Spleißvarianten, die eine transkriptionale Regulation vermuten lassen (Moretta et al., 1995). Die Peptide in den MHC-I-Molekülen können die Bindung der KIRs beeinflussen (Malnati et al., 1995). Inhibitorische KIRs weisen deutlich höhere Affinitäten als ihre aktivatorischen Spleißvarianten auf (Biassoni et al., 1997). Strukturanalysen von KIRs mit ihren MHC-Liganden deuten zudem kinetische Aspekte an (Natarajan et al., 2002).

Tabelle 1 - Humane inhibitorische NK-Zellrezeptoren

KIRs	Anmerkungen		Liganden
p58.1, <i>NKAT1</i> (CD158a)	KIR 2 <u>DL</u> 1*	Spleißvariante von p50.1	HLA-Cw2,4,5,6 (Asn77- <u>Lys</u> 80) **
p58.2, <i>NKAT6</i> (CD158b1)	KIR2DL2	Spleißvariante von p50.2	HLA-Cw1,3,7,8 (Ser77- <u>Asn</u> 80) **
p58.3, <i>NKAT2</i> (CD158b2)	KIR2DL3	Spleißvariante von p50.3	?
CD158d	KIR2DL4	auf allen NK-Zellen (?)	HLA-G
CD158f	KIR2DL5		?
p70, <i>NKAT3</i> , <i>NKB1</i> (CD158e1)	KIR3DL1		HLA-B (Gumperz et al., 1997)
p140, <i>NKAT4</i> (4a/b) (CD158k)	KIR3DL2	Homodimer	HLA-A3,-A11
KIRC1 (CD158z)	KIR3DL7		?
KIR103AS		Homologien zu p58 und p70	? (Selvakumar et al., 1996)
ILT-2 (CD85j)	LIR-1	LIR-Familie (<i>leukocyte Ig-like receptors</i>)	UL18 - ein hCMV-kodiertes MHC-Klasse-I-Homolog
C-Typ Lektine	Anmerkungen		Liganden
CD94/NKG2A,B (CD159A,B)	Heterodimer, NKG2A/B sind Spleißformen		HLA-E
NKRP1A	Maus-NKRP1 ist aktivatorisch		?

* KIR~~2~~DL1 = 2 extrazelluläre Ig-Domänen, lange („Long“) zytoplasmatische Domäne = inhibitorischer KIR,

KIR2DS1 = kurze („Short“) zytoplasmatische Domäne = aktivatorischer KIR (siehe Tabelle 2)

** HLA-C-Dimorphismus in den Aminosäuren 77 und 80 der HLA- α 1-Domäne

Die zweite große Gruppe NK-Zellrezeptoren gehört zur **C-Typ Lektin-Familie** und ist auf dem Locus 12p12.3-13.1 lokalisiert. NKG2A und -B formen zusammen mit CD94 inhibitorische Rezeptoren, während NKG2C, -E und -F mit CD94 aktivatorische Rezeptoren bilden. Diese heterodimeren Rezeptoren erkennen das nichtklassische MHC-Ib-Molekül HLA-E, das Nonapeptide aus den Signalpeptiden anderer MHC-I-Moleküle präsentiert. Modelle postulieren, daß CD94 an die α 1-Domäne und NKG2 an die α 2-Domäne von HLA-E binden. Das eingelagerte Peptid wird von NKG2 erkannt und beeinflusst die Affinität des CD94/NKG2-Komplexes. Peptide aus den *Leader*-Sequenzen der meisten HLA-Klasse-I-Moleküle werden vom inhibitorischen CD94/NKG2A-Komplex mit höherer Affinität als vom aktivatorischen CD94/NKG2C-Komplex gebunden. Eine Ausnahme bilden Peptide aus dem HLA-G-*Leader*, die vom CD94/NKG2C-Komplex mit höherer Affinität erkannt werden (Llano et al., 1998).

Tabelle 2 - Humane aktivatorische NK-Zellrezeptoren

KIRs		Anmerkungen	Signalmolekül	Liganden
p50.1 (CD158h)	KIR2DS1	Spleißform von p58.1	DAP12	HLA-Cw2,-Cw4,-Cw5, -Cw6
p50.2 (CD158j)	KIR2DS2	Spleißform von p58.2	DAP12	HLA-Cw1,-Cw3,-Cw7, -Cw8
p50.3, <i>NKAT8</i> (CD158i)	KIR2DS4	Spleißform von p58.3	DAP12	HLA-C-Allele
<i>NKAT9</i> (CD158g)	KIR2DS5		DAP12	?
<i>KIRX</i> (CD158c)	KIR2DS6		DAP12	?
<i>NKAT10</i> (CD158e2)	KIR3DS1		?	HLA-A/B-Allele
C-Typ Lektine		Anmerkungen	Signalmolekül	Liganden
NKG2C,E, F		Heterodimere mit CD94	DAP12	HLA-E
NKG2D		Homodimer, assoziiert <u>nicht</u> mit CD94, kann inhibitorische KIRs übertrumpfen	DAP10, ζ -Kette	MICA, ULBPs, Maus: RAE-1, H60 (Cosman et al., 2001)
NCRs		Anmerkungen	Signalmolekül	Liganden
Fc(γ)RIIIa (CD16a)		IgG-Fc-Rezeptor mit niedriger Affinität, vermittelt den ADCC	γ -, ζ -Kette	IgG (Fc-Teil, CH ₂ -Domäne)
NKp30			γ -, ζ -Kette	unbek. nicht-MHC-Ligand
NKp44		<i>de novo</i> nach IL-2-Aktivierung	DAP12	nicht-MHC-Liganden:
NKp46		in allen NK-Zellen, unabhängig ob aktiviert oder nicht (erkennt auch Strukturen auf Mauszellen)	γ -, ζ -Kette	Influenza-Hämagglutinin (HA), Parainfluenza-HA/Neuraminidase u. a.

DAP10 (KAP10) 10 kDa Adaptorprotein mit YNIM-Motiv (Bindungsstelle für die p85-Untereinheit der PI3K)

DAP12 (KARAP12) ... 12 kDa Adaptorprotein mit ITAM-Motiv (Signaltransduktion über Syk und ZAP70)

MICA/B ... streßinduzierbare polymorphe MHC-Klasse-I-homologe Proteine auf vielen epithelialen Tumoren

ULBPs (*UL16-binding proteins*) ... binden an das CMV-Glykoprotein UL16 (Kubin et al., 2001)

Neben den aktivatorischen MHC-Rezeptoren wurde eine Reihe aktivatorischer NK-Rezeptoren entdeckt, die Streßproteine und bestimmte virale Proteine erkennen und die Zytotoxizität der NK-Zellen auslösen (NCRs, *natural killer cytotoxicity triggering receptors*). Der Korezeptor 2B4 unterstützt das Signal einiger aktivatorischer NK-Zellrezeptoren (Chuang et al., 2000; Chuang et al., 2001; Johnson et al., 2000). Die humane NK-Zelllinie YT erkennt und lysiert CD80⁺ Tumorzellen über CD28 (Azuma et al., 1992). Während Maus-NK-Zellen CD80⁺/CD86⁺ Tumorzellen ebenfalls über CD28 erkennen, werden für humane NK-Zellen andere Rezeptoren für CD80/86 vermutet (Lang et al., 1998; Wilson et al., 1999). Obwohl NK-Zellen Antigene über MHC-Klasse-I/-II präsentieren können und außerdem kostimulatorische Moleküle exprimieren (Roncarolo et al., 1991), ist die mögliche Funktion der NK-Zellen als APCs bisher unklar.

Tabelle 3 - Andere Rezeptoren, Korezeptoren und kostimulatorische Moleküle der NK-Zellen

(Ko-)Rezeptor	Anmerkungen
CD244 (2B4), CD2-Subfamilie ^{**}	Korezeptor für verschiedene NCRs (z. B. Nkp46), Ligand CD48
Nkp80	Homodimer, vermutlich Korezeptor (Vitale et al., 2001b)
CD226 (DNAM-1)	assoziiert mit LFA-1, kann Zytotoxizität auslösen (Bottino et al., 2003; Shibuya et al., 1996; Shibuya et al., 1998; Shibuya et al., 1999)
CD69	C-Typ Lektin, unbekannter Ligand, erster Aktivierungsmarker
CD40L ^{**}	bindet CD40, löst Zytotoxizität der Maus-NK-Zellen aus (Martin-Fontecha et al., 1999)
CD28 ^{*,**}	bindet an CD80/CD86, löst Zytotoxizität der Maus-NK-Zellen und der humanen NK-Zelllinie YT aus
CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) ^{*,**}	bewirkt Kostimulation von T-Zellen
MHC-Klasse-I/-II ^{*,**}	Antigenpräsentation

* auf der humanen NK-Zelllinie YT

** auf der humanen NK-Zelllinie NK92 (Maki et al., 2001)

1.5.4 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle (Tabelle 4) spielen eine wichtige Rolle bei der NK-Zellzytotoxizität (Gahmberg et al., 1998). Die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber bestimmten Tumorzelllinien lässt sich durch Antikörper gegen CD18 (oder CD11a+b+c), CD54, CD2 und RGD-bindende Integrine teilweise oder bei gemeinsamer Gabe vollständig blocken (Timonen et al., 1990). Adhäsionsmoleküle vermitteln außerdem die Adhäsion der NK-Zellen an Endothelien und ihre Migration in Gewebe (Ferrara, 1996).

Tabelle 4 - Adhäsionsmoleküle auf NK-Zellen

Adhäsionsmoleküle	Ligand und Funktion, Anmerkungen
Integrine	α/β-Heterodimere, die an Zelladhäsionsmoleküle und an die Extrazellulärmatrix binden (starke Adhäsion)
$\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18, LFA-1)	ICAM-1, siehe DNAM-1 (Tabelle 3)
$\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, Mac-1, CR-3)	ICAM-1, iC3b (Komplement), Fibrinogen, ICAM-2-Peptid (Li et al., 1995), Lyse iC3b-opsonylierter Bakterien und Zellen
$\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18, p150.95, CR-4)	CD58 (LFA-3), iC3b
$\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1)	MAdCAM-1 (<i>mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>), NK-Zellen binden nur schwach (Rott et al., 1996)
$\alpha_E\beta_7$ (α_E = CD103)	E-Cadherin (<i>epithelial cadherin</i>)

Adhäsionsmoleküle	Ligand und Funktion, Anmerkungen
Selektine	binden an Kohlenhydratpitope, vermitteln schwache Adhäsion an Endothelien („Rolling“)
L-Selektin (MEL-14, CD62L)	sulfatiertes Lewis ^X , GlyCAM-1, CD34 (Sialomucin), MAdCAM-1
RGD-bindende Integrine	Adhäsion an RGD-Matrixproteine
$\alpha_1\beta_1$ (CD49a/CD29, VLA-1)	Kollagen, Laminin-1, auf aktivierten NK-Zellen
$\alpha_2\beta_1$ (CD49b/CD29, VLA-2)	Kollagen, Laminin, auf aktivierten NK-Zellen
$\alpha_3\beta_1$ (CD49c/CD29, VLA-3)	Laminin-5, Fibronectin, Kollagen, Entactin, Invasin, aktivierte NK-Zellen
$\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29, VLA-4)	Fibronectin (CS1-Peptid), VCAM-1 (CD106)
$\alpha_5\beta_1$ (CD49e/CD29, VLA-5)	Fibronectin (Peptid: GRGDSP) (Gismondi et al., 1991)
$\alpha_6\beta_1$ (CDw49f/CD29, VLA-6)	Laminin, Invasin, Merosin (Lowdell et al., 1995)
Immunoglobulinfamilie	Zelladhäsion, Ziel für Integrine
CD2 (LFA-2)	LFA-3
CD50 (ICAM-3)	LFA-1
CD54 (ICAM-1)	LFA-1, Mac1
CD58 (LFA-3)	CD2
CD44-Familie	Zelladhäsion
CD44H (H-CAM, pgp-1)	Hyaluronsäure, auch Fibronectin, Kollagen und sulfatierte Proteoglykane

1.5.5 Signaltransduktion

Die aktivatorischen NK-Zellrezeptoren (Moretta et al., 2000a; Moretta et al., 2001) der KIR- und C-Typ-Lektin-Familie zeichnen sich durch eine kurze zytoplasmatische Domäne aus und sind nichtkovalent mit Signalmolekülen, wie der CD3 ζ -Kette, der Fc-Rezeptor- γ -Kette, DAP10 oder DAP12 (Tabelle 2), assoziiert. Diese Signalmoleküle sind Transmembranproteine mit einem sehr kurzen extraplasmatischen Anteil. Sie bilden disulfidverknüpfte Homodimere, z. T. auch Heterodimere. γ -, ζ -Kette und DAP12 enthalten zytoplasmatische aktivatorische Signalmotive (ITAMs, *immunoreceptor tyrosine activatory motifs*) mit je 2 Tyrosinphosphorylierungsstellen (YxxL/I), die durch 6 – 8 AS getrennt sind. Kinasen der src-Familie, wie Syk und ZAP70 (*ζ -associated protein-70*), binden über ihre SH2-Domänen (*src homology 2*) an die ITAMs und aktivieren eine Vielzahl von Signalwegen. Die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) steht im Zentrum der NK-Zellzytotoxizität (Jiang et al., 2000) und führt über den MAPK-(*mitogen activated protein kinase*)-Signalweg (Brumbaugh et al., 1997; Brumbaugh et al., 1996; Galandrini et al., 1999) zur ERK2-

Aktivierung (*extracellular signal regulatory kinase 2*), die über das Zytoskelett die Mobilisation der zytotoxischen Granula in Richtung gebundener Zielzelle auslöst (Carretero et al., 2000; Trotta et al., 1998; Wei et al., 1998). Das YINM-Signalmotiv von DAP10 (YMNM bei CD28) bindet direkt an die p85-Untereinheit der PI3K (Abbildung 2).

Die inhibitorischen NK-Zellrezeptoren der KIR- und C-Typ-Lektin-Familie besitzen eine längere zytoplasmatische Domäne mit inhibitorischen Sequenzmotiven, den ITIMs (*immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs*). Die inhibitorischen ITIMs rekrutieren SHP-1 (*SH2 containing protein tyrosine phosphatase*). SHP-1 inaktiviert u. a. Vav-1, wodurch der MAPK-Signalweg und die NK-Zellzytotoxizität gehemmt werden (Abbildung 2).

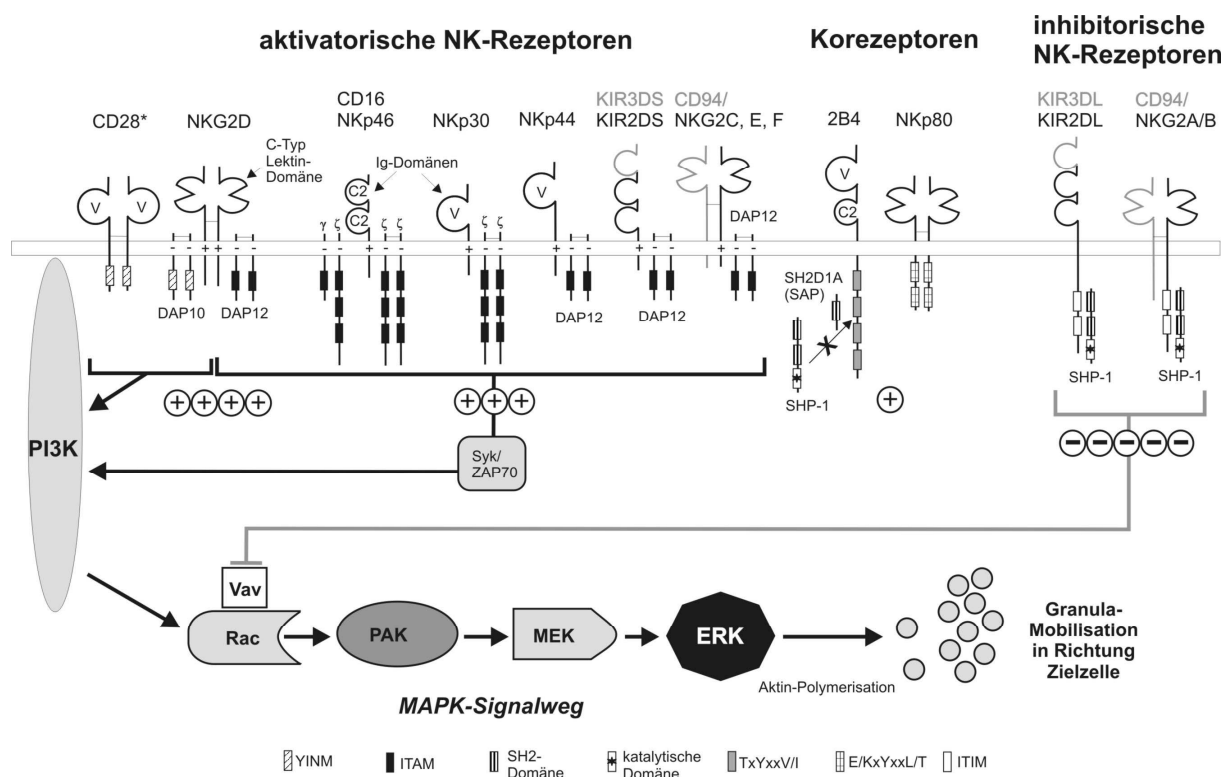


Abbildung 2 - Signaltransduktion in NK-Zellen

Die aktivatorischen NK-Rezeptoren lösen über die PI3K und den MAPK-Signalweg die Aktivierung der ERK2-Kinase aus, die die Mobilisierung der zytotoxischen Granula bewirkt. Korezeptoren unterstützen diesen Signalweg. Inhibitorische NK-Rezeptoren inaktivieren über die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 den Rac-1-Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav-1 und hemmen den MAPK-Signalweg.

1.5.6 Zytotoxische Mechanismen der NK-Zellen

NK-Zellen und CTL verfügen über zwei Wege, ihre Zielzellen zu lysieren (Smyth, 1995). Sie können über **Fas-Ligand** (FasL, CD95L) die Apoptose in *fas*⁺ (CD95, Apo-1) Zielzellen auslösen (Arase et al., 1995). FasL, das zur TNF-Familie gehört und Homotrimere bildet,

bindet an trimere *fas*-Komplexe auf den Zielzellen, deren intrazelluläre „*Death*“-Domänen die Caspase-8 aktivieren und damit die Apoptose der Zelle einleiten.

Der zweite Mechanismus ist die **sekretorische Perforin-vermittelte Lyse**. Nach Verschmelzung der zytotoxischen Granula mit der Plasmamembran (Ca^{++} -abhängig) werden die enthaltenen Perforine und Granzyme in Richtung Zielzelle ausgeschüttet. Aufgrund der engen Bindung der NK-Zellen an ihre Zielzellen (Abbildung 3) können die Perforine Löcher in der Membran der Zielzellen erzeugen, über die die Granzyme eingeschleust werden. Die Granzyme aktivieren durch partielle Proteolyse Caspasen und lösen die Apoptosekaskade aus. Die Perforation der Zellmembran führt außerdem zum Zusammenbrechen des Membranpotentials und zur direkten Lyse der Zielzellen (Nekrose).

Die Ablauf der Targetzellyse läßt sich wie folgt unterteilen (Djeu et al., 2002):

1. Erkennung und Bindung an die Zielzellen (Targetzellerkennung)

siehe 1.5.2 – 1.5.4 und Abbildung 3

2. Signaltransduktion in den NK-Zellen

siehe Abschnitt 1.5.5 und Abbildung 2

3. Austeilung des lethalen Schlages (Sekretion der zytotoxischen Faktoren)

siehe Text

4. Effektorzellunabhängige Phase der Lyse (Apoptose, Nekrose)

Die abschließende Phase läuft unabhängig von den Effektorzellen in der Zielzelle ab und endet mit ihrer Apoptose oder Nekrose.

5. Effektor-Recycling

Im Gegensatz zu den CTL (Weijtens et al., 1996) verfügen NK-Zellen über kein effektives „Effektor-Recycling“, das die Lyse mehrerer Zielzellen durch eine Effektorzelle innerhalb weniger Stunden ermöglicht. Dieser Mangel wird durch die große Zahl und die breite Spezifität der NK-Zellen ausgeglichen.

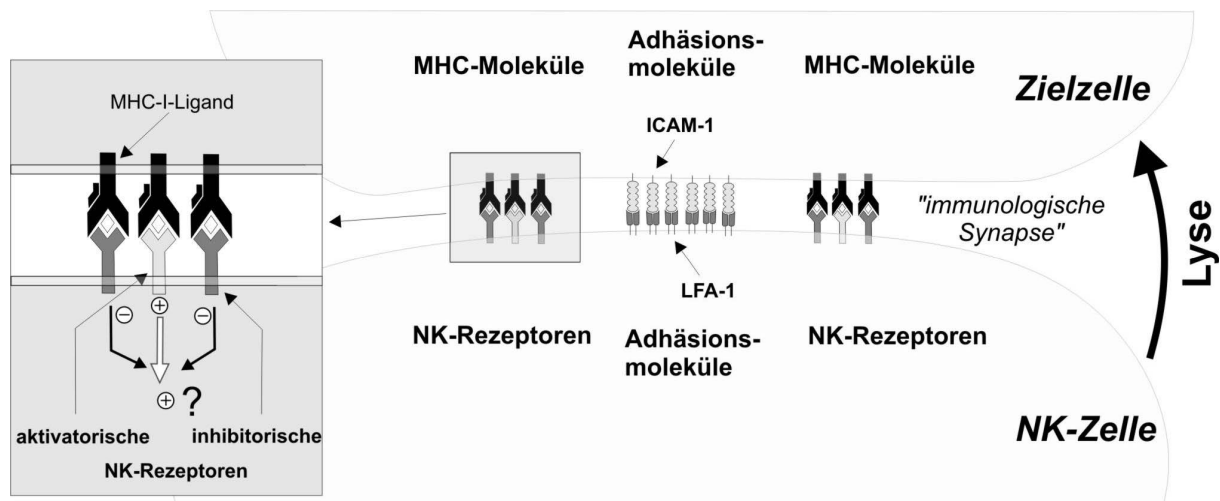


Abbildung 3 - „Immunologische Synapse“ zwischen NK-Zelle und Zielzelle

Die NK-Zellen binden über Adhäsionsmoleküle an die Zielzellen, die sich im Zentrum der Kontaktstelle ansammeln. Um dieses Zentrum formiert sich ein Ring aus inhibitorischen NK-Rezeptoren. Dort werden ebenfalls die aktivatorischen NK-Rezeptoren und Korezeptoren vermutet. Die gemeinsame Lokalisation inhibitorischer und aktivatorischer Rezeptoren sowie die enge Verbindung von NK- und Zielzelle ermöglicht eine optimale Erkennung, Signaltransduktion und Lyse der Zielzellen mit geringen Kolateralschäden. T-Zellen bilden ähnliche immunologische „Synapsen“ mit APCs und Zielzellen aus.

1.5.7 Eigenschaften der humanen NK-Zelllinie YT

In dieser Arbeit wird die humane NK-Zelllinie YT (Yodoi et al., 1985) eingesetzt. YT-Zellen wachsen *in vitro* unbegrenzt und unabhängig von IL-2. Aus der NK-Zelllinie NK-92 konnte erst nach Transfektion mit dem IL-2-Gen die zytokinunabhängig wachsende Subline NK92ci hergestellt werden (Tam et al., 1999). YT-Zellen lysieren Tumorzelllinien MHC-unabhängig über die Freisetzung von Perforinen und Granzymen (Bochan et al., 1995) oder über FasL (Montel et al., 1995a). Eine Zytotoxizität gegenüber gesunden Geweben wurde nicht beschrieben. YT-Zellen besitzen einen aktivierten NK-Zellphänotyp und sind CD7⁺, CD25⁺, CD28⁺, CD30⁺, CD45RO⁺, CD56⁺ und HLA-DR⁺ sowie CD2⁻, CD8⁻, CD11⁻, CD16⁻ und CD57⁻. In der YT-Zelllinie wurde ein 3,2 kB großer Abschnitt des EBV-Genoms gefunden, der möglicherweise für die Immortalisierung der Zellen verantwortlich ist (Yoneda et al., 1992). Eine Besonderheit der NK-Zelllinie YT ist die Möglichkeit, sie mit Plasmidvektoren durch Elektroporation zu transfizieren (Bochan et al., 1995; Montel et al., 1995a; Sorachi et al., 1992). Andere NK-Zelllinien erfordern häufig einen retroviralen Gentransfer (Nagashima et al., 1998; Tran et al., 1995). Die Erkennungseigenschaften der YT-Zelllinie konnten durch Transfektion mit Rezeptorgen verändert werden (Liu et al., 1994; Schirrmann und Pecher, 2001).

1.6 Rekombinante Antikörper für ein Immuntargeting

1.6.1 Antikörper

Antikörper (Abbildung 4) sind aus zwei unterschiedlichen Immunglobulinketten aufgebaut, der leichten und der schweren Kette. Am N-Terminus jeder Kette befindet sich eine variable (V) Domäne mit 3 hypervariablen Abschnitten von 5 – 15 Aminosäuren, den CDRs (*complementary determining regions*). Die CDRs ragen als Loops aus den V-Regionen und vermitteln die Antigenbindung. Die CDRs werden durch ein Gerüst (*frame work*) aus rigiden β -Faltblattstrukturen (β -barrels) stabilisiert. An die V-Regionen schließen sich die konstanten (C) Regionen an, die über Disulfidbrücken die Immunglobulinketten verbinden, die V-Regionen stabilisieren und die Bindung immunologischer Effektoren vermitteln.

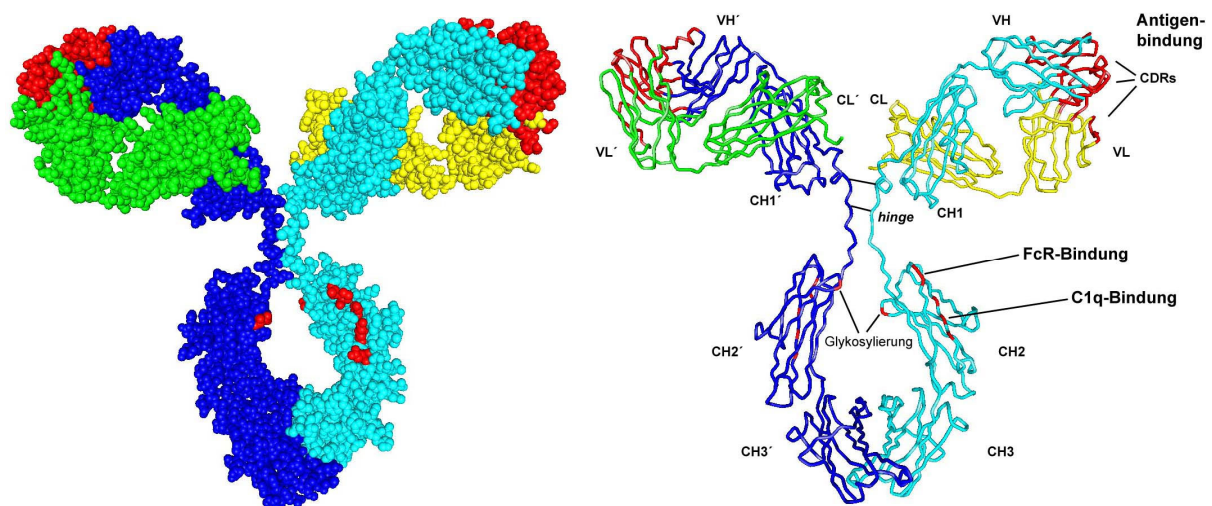


Abbildung 4 - Molekularstruktur eines IgG1-Antikörpers

Die Molekularstruktur des humanen IgG1 (modifiziert nach Clark, 1997). Die V_L - und V_H -Domänen verfügen über 3 hypervariable Loops (CDRs, rot), die die Antigenbindung vermitteln. In der *hinge*-Region sind die schweren Immunglobulinketten über Disulfidbrücken verbunden. Die Bindungsstellen für die $Fc(\gamma)RIIIa$ -Kette der NK-Zellen und das Komplement C1q wurden angegeben (rechts – Van-der-Waals-Radien, links – Peptidrückgrat, V – variable Region, C – konstante Region, L – leichte Kette, H – schwere Kette).

Die große Diversität der Antikörper wird durch somatische Rekombination erreicht, die in jeder B-Zelle im Laufe ihrer frühen Entwicklung stattfindet. Dabei werden die V-Regionen beider Ketten aus mehreren Gensegmenten, die mit V (*variable*), J (*joining*) und D (*diversity*, nur schwere Kette) bezeichnet werden, auf genomischer Ebene zusammengesetzt. Ein Großteil der Antikörperspezifität geht auf die CDR3 der schweren Kette zurück (Xu und Davis, 2000). Die anfänglich geringe Affinität der Antikörper wird durch Oligomerisierung

ausgeglichen (IgM). Während der B-Zellaktivierung in den Keimzentren der sekundären Follikel in Lymphknoten und Milz durchlaufen die B-Zellen Zyklen von Hypermutation in den Immunglobulingenen (Zentroblasten, dunkle Zone) und Affinitätsselektion gegenüber antigenträgenden follikulären dendritischen Zellen (Zentrozyten, helle Zone). Diese **Affinitätsreifung** führt zu B-Zellen mit hochaffinen Antikörpern, die einen „class-switch“ der schweren Kette durch erneute somatische Rekombination durchlaufen und andere Antikörper-Isotypen bilden (IgM → IgG, IgA oder IgE). Reife B-Zellen differenzieren zu Gedächtnis-B-Zellen oder zu Plasmazellen, den terminal ausdifferenzierten antikörperproduzierenden Zellen.

1.6.2 Erzeugung humaner Antikörper

V_L-Region von BW431/26 und HuM195

```

CDRs          <-----L1----->          <--L2-->          <--L3-->

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC STSSSVSY---MH WYQQKPGKAPKLLIY STSNLAS GVPSRFGSGSGTDFTFTISSIQFEDIATYYC HQWSSYP-T FGQGTKVEIK
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC RASEDNYGISFMN WFQQKPGKAPKLLIY AASNQGS GVPSRFGSGSGTDFTLTITISLQPDFFATYYC QQSKEVFWT FGQGTKVEIK

~!! TQ P S!S!S!G VTI% C S ! WYQQK G PK!LIY % S GVP RFGSGS!SGT %L IS ! ED ! Y#C FG GTK

```

V_L-Konsus aus <http://acrmwww.biochem.ucl.ac.uk/abs/lc.align>

V_H-Region von BW431/26 und HuM195

```

CDRs
Kabat          <-H1->          <-----H2----->          <---H3--->
AbM            <----H1---->          <---H2--->          <---H3--->
Chothia        <--H1-->          <-H2->          <---H3--->

QVQL-QESGPGGLVRPSQILSLTCTVS GFTISSGYSWH WVRQPPGRGLEWIG YIQ-YSGITNYPNPSLKS RVIMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR EDYDHWYFDV WQGGTIVTVSS
QVQL-VQSGAEVKKPGSSVKVCKAS GYFTFDYN-MH WVRQAPGGGLEWIG YIYPYNGGTGYNQKFKS KATITADESTNTAYMELSLRSEDVAVYYCAR GRPAM----DY WQGGTIVTVSS

VQL* SG L! PG S!S!SC !S G#%F% WV$Q PG$ LEW!! I G Y K! $ !% D S %!Y SL ED%A YYC DY WQGGT VIVSS

```

V_H-Konsus aus <http://acrmwww.biochem.ucl.ac.uk/abs/hc.align>

```

~ ... saure AS          # ... aromatische AS          % ... AS mit Hydroxylgruppe
! ... hydrophobe AS    $ ... basische AS          & ... schwefelhaltige AS
* ... H4A-Insertion (sehr selten)

```

Abbildung 5 - V-Regionen der humanisierten Antikörper BW431/26 und HuM195

Die Aminosäuresequenzen der V-Regionen der humanisierten Antikörper BW431/26 (obere Sequenz) und HuM195 (untere Sequenz) wurden mit den **Konsensusbereichen (fett)** humaner Antikörper dargestellt. Die CDRs (<->) wurden gekennzeichnet. Bei der V_H-Region wurden die CDR-Definitionen nach **Kabat** (Längenpolymorphismus der hypervariablen Bereiche, Kabat et al., 1987; Wu und Kabat, 1970), die Definition nach **Chothia** (Antigenbindungsstellen, Chothia und Lesk, 1987; Chothia et al., 1989) und die **AbM**-Definition (*Oxford Molecular's antibody modelling software AbM*) angegeben. Andere CDR-Definitionen werden aus Kristallographiedaten nach dem Antigenkontakt (MacCallum et al., 1996) oder mit mathematischen Methoden (Honegger und Pluckthun, 2001) festgelegt (nicht gezeigt).

Die meisten monoklonalen Antikörper wurden in der Maus mit der Hybridom-technologie hergestellt. Sie beruht auf der Isolation von B-Zellen aus der Milz immunisierter Mäuse. Die B-Zellen werden mit immortalisierten Myelomzelllinien zu Hybridomen fusioniert. Die Herstellung humaner Hybridome ist dagegen äußerst schwierig. Maus-Antikörper können durch Austausch des *Frameworks* der V-Regionen in einem aufwendigen „*Reshaping*“-Prozeß humanisiert werden (Abbildung 5). Die humanisierten Antikörper BW431/26 und HuM195 wurden auf diese Weise erzeugt (Caron und Scheinberg, 1993; Gussow und Seemann, 1991). Displaytechnologien ermöglichen die direkte Isolation humaner Antikörperfragmente (siehe 1.6.4).

1.6.3 Konstruktion von single-chain-Antikörper-Fragmenten

Die antigenbindenden Fv-Fragmente sind schwer durch Proteolyse zu erhalten, und ihnen fehlt die Stabilität der Fab'-Fragmente (Sharon und Givol, 1976). V_H - und V_L -Domäne können durch Vernetzung mit Glutaraldehyd (Glockshuber et al., 1990) oder durch Einfügen intermolekularer Disulfidbrücken mittels ortsgerichteter Mutagenese stabilisiert werden (Jung et al., 1994). Die Verknüpfung beider V-Regionen über einen Peptid-*Linker* zu einem *single-chain* Fv- (scFv-) Fragment (Abbildung 6) hat sich jedoch durchgesetzt (Bird et al., 1988; Owens und Young, 1994; Whitlow et al., 1993).

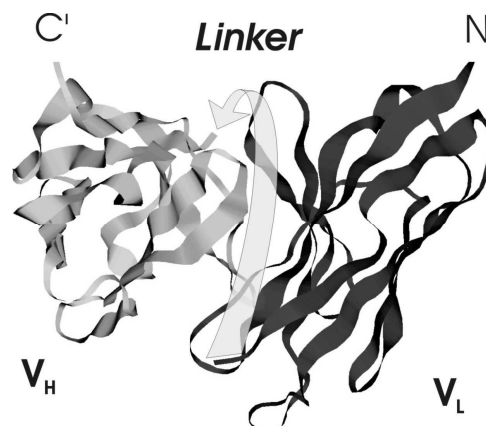


Abbildung 6 - Struktur eines single-chain-Fv-Fragments

Fv-Fragmente von Antikörpern können über einem flexiblen und löslichen Peptid-*Linker* zu scFv-Fragmenten verbunden werden.

Die Konstruktion von scFv-Fragmenten umfaßt folgende Schritte:

1. Isolation der cDNA der V-Regionen
2. Konstruktion des scFv-Konstruktes (Verbindung von V_H und V_L über einen *Linker*)
3. Expression, Reinigung und Analyse des scFv-Proteins

Die cDNA-Sequenzen der V-Regionen werden aus dem Hybridom isoliert. Aufgrund unterschiedlicher Allele müssen evtl. mehrere Kombinationen ausgetestet werden. Obwohl beide Orientierungen der V-Regionen ($V_H / \text{Linker} / V_L$ oder $V_L / \text{Linker} / V_H$) für die Konstruktion von scFv-Fragmenten möglich sind, bevorzugen einige scFv-Konstrukte eine Anordnung hinsichtlich Expression und Affinität (Tsumoto et al., 1994). Es gibt jedoch keine allgemeine Präferenz (Breitling und Dübel, 1997).

Tabelle 5 - *Linker*-Sequenzen zur Konstruktion von scFv-Fragmenten

Länge	<i>Linker</i> -Sequenz	Referenzen
10-25	(GGGGS) _n , n=2-5	(Chaudhary et al., 1989; Freund et al., 1993; Huston et al., 1993)
11	LLLIFFPPSSEE	(Condra et al., 1990)
14 (19)	LLLIFFPPSSGGGGS (GGGGS)	(Condra et al., 1990)
15	ESGRSGGGSGGGGS	(Bird et al., 1988)
14	EGKSSGSGSESKST	(Batra et al., 1990)
14	EGKSSGSGSESKVD	(Batra et al., 1990)
13	EGLSSGSGESKST	(Bird et al., 1988)
14	SSPSVTTLFPPSSNG	(Anand et al., 1991)
15	LTVSSGGGSGGGGS	(Anand et al., 1991)
16	SSPSVTGGGSGGGGS	(Anand et al., 1991)
16	LTVSSALTPPSVYPL	(Anand et al., 1991)
18	KESGSVSSEOLAQFRSLD	(Bird et al., 1988)
12	GKSSGSGSESKS	(Whitlow et al., 1993)
14	GSTSGSGKSSEGGK	(Whitlow et al., 1993)
18	GSTSGSGKSSEGGSGSTKG	<i>Linker-212</i> (Whitlow et al., 1993)
18	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	<i>Linker-218</i> (Whitlow et al., 1993)

Der Peptid-*Linker* (Tabelle 5) muß die Distanz von 3,5 nm zwischen C-Terminus und N-Terminus der V-Regionen im Fv-Fragment überwinden (Abbildung 6). Ausgehend von der Länge einer Peptidbindung von 0,38 nm sind mindestens 10 AS erforderlich. *Linker* mit 15 – 18 AS Länge scheinen optimal zu sein. Außerdem muß der *Linker* eine hohe Flexibilität (Gly) und eine hohe Löslichkeit (Ser, Thr) aufweisen. Einige *Linker* ersetzen einen Teil der konstanten Region des Antikörpers (Condra et al., 1990) oder sind von bestimmten Proteinen abgeleitet (Bird et al., 1988). In dieser Arbeit wurde der *Linker-218* eingesetzt (Whitlow et al., 1993). Er hat eine Länge von 18 AS und enthält viele Gly-, Ser- und Thr-Reste. Zusätzlich wurden zwei positivgeladene Lys-Reste und ein negativgeladener Glu-Rest eingefügt. Der Lys-Rest nahe dem N-Terminus der V_H -Domäne (Orientierung: $V_L / \text{Linker} / V_H$) ersetzt die positive Ladung, die in der V_H -Region bei der scFv-Konstruktion verloren geht. Der Pro-Rest verbessert die proteolytischen Stabilität verglichen mit dem *Linker-212*.

1.6.4 Displaytechnologien zur Isolation von Antikörperfragmenten

Humane scFv-Fragmente können mittels Displaytechnologien, die auf der Kopplung von Gen und Genprodukt beruhen, direkt isoliert werden (Breitling und Dübel, 1997; Owens und Young, 1994). Das Phagendisplay ist am weitesten verbreitet. Der filamentöse *E. coli*-Phage M13 bindet über pIII an die F-Pili von *E. coli* (F'-Stämme). In pIII können fremde Gensequenzen, z. B. für scFv-Fragmente, ohne größere Funktionsbeeinträchtigung eingebaut werden. Die infizierten *E. coli* bilden 100–200 sehr robuste Phagenpartikel. Durch wiederholte Zyklen von Selektion gegenüber dem Antigen und Infektion von *E. coli* werden Phagen mit antigenspezifischen scFv-Fragmenten angereichert. Die Isolation hochaffiner scFv-Fragmente erfordert jedoch häufig riesige Phagenbibliotheken. Die Phagendisplaytechnik hat bisher die klassische Hybridomtechnologie noch nicht verdrängt.

1.6.5 Expression von scFv-Fragmenten

Die Expression von scFv-Fragmenten wurde in Myelomzelllinien, Baculoviren (Potter et al., 1993) und Hefen (Davis et al., 1991) beschrieben. Bei der bakteriellen Expression von scFv-Proteinen hat sich die periplasmatische Expression in *E. coli* durchgesetzt (Pluckthun, 1991; Skerra und Pluckthun, 1988). Die erforderliche N-terminale *Leader*-Sequenz (*ompA*, *phoA*, *pelB*, *bla*) wird beim Transfer ins Periplasma proteolytisch entfernt. Die Expression funktioneller scFv-Proteine hängt sehr von dem jeweiligen Konstrukt ab. Die Faltungseffizienz und Expression kann durch einzelne Positionen im *Framework* der V-Regionen aber auch in den antigenspezifischen CDRs beeinflusst werden (Ito et al., 1993). Außerdem verfügen Bakterien über eine andere Verteilung und Nutzung der Kodons (*codon usage*). Eine Neukodierung humaner cDNAs oder die Verwendung von *E. coli*-Stämmen mit zusätzlichen Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Genen kann die Expression verbessern (Kleber Janke und Becker, 2000). Disulfidbrücken werden aufgrund reduzierender Bedingungen im Zytoplasma von *E. coli* unterdrückt und erst nach Sekretion ins Periplasma gebildet. Neuere Daten weisen auch auf eine Oxidation im Zytosol hin (Fernandez und de Lorenzo, 2001). Die Bedeutung von Disulfidisomerasen für die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in zellfreien Expressionssystemen demonstriert, während Chaperone nur die Gesamtausbeute an scFv-Protein beeinflussen (Ryabova et al., 1997). Die Koexpression des Chaperonins GroES/L oder die Überexpression der Peptidylprolyl-*cis,trans*-Isomerase FkpA fördert die periplasmatische Expression und die Ausbeute korrekt gefalteter scFv-Fragmente (Bothmann und Pluckthun, 2000; Duenas et al., 1994; Ramm und Pluckthun, 2000). Fremdproteine mit hydrophoben Anteilen werden meistens in den Einschlußkörperchen (*inclusion bodies*) abgelagert. Sie

müssen durch vollständige Denaturierung in Lösung gebracht werden und durch langsamen Wechsel von denaturierenden reduktiven Bedingungen zu nativen oxidativen Bedingungen zurückgefaltet werden („*refolding*“). Dadurch kann die Ausbeute an funktionellem scFv-Protein extrem sinken. Trotzdem gibt es auch Bestrebungen, scFv-Fragmente im großen Maßstab zytoplasmatisch in *E. coli* zu exprimieren (Martineau et al., 1998; Sanchez et al., 1999).

1.6.6 Bispezifische Antikörper für ein Immuntargeting

Bispezifische Antikörper enthalten die Bindungsstellen von zwei unterschiedlichen Antikörpern. Die klassische Methode ist die Herstellung von Hybridom-Hybridomen (Quadrome), die jedoch auch nichtfunktionelle und monospezifische Varianten produzieren. Moderne Antikörpertechnologien umgehen dieses Problem. Bei der Herstellung bispezifischer „*Diabodies*“ kann beispielsweise die Zusammenlagerung von scFv-Fragmenten, insbesondere mit kurzen *Linker*-Sequenzen (< 13 AS), zu Dimeren ausgenutzt werden (Atwell et al., 1999; Hudson und Kortt, 1999; Wu et al., 1996). *Diabodies*, die gleichzeitig an zytotoxische Lymphozyten und Tumorzellen binden, können für ein *Tumortargeting* (Abbildung 7) eingesetzt werden (Kipriyanov et al., 1998). Der therapeutische Einsatz bispezifischer Antikörper unterliegt jedoch den Einschränkungen der Antikörpertherapien (siehe 1.1).

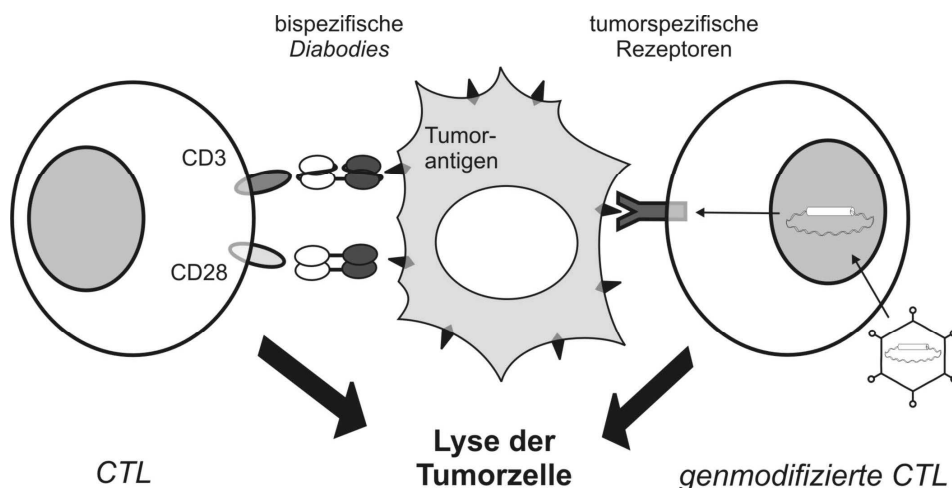


Abbildung 7 - Immunologisches Targeting von CTL

CTL können über bispezifische Antikörper, die CD3 und ein Tumorantigen (TAA) binden, Tumorzellen erkennen und lysieren. Die effektive Wirkung der CTL erfordert die Kostimulation von CD28. NK-Zellen wurden mit CD16 x TAA- oder CD2 x TAA-bispezifischen *Diabodies* erfolgreich gegen Tumorzellen abgerichtet. Eine weitere Möglichkeit für ein *Tumortargeting* zytotoxischer Lymphozyten besteht in ihrer genetischen Modifikation mit tumorspezifischen Rezeptoren (Abschnitt 1.7).

1.7 Tumorspezifische Rezeptoren für ein Immuntargeting

1.7.1 Voraussetzungen an ein rezeptorvermitteltes Targeting

Das *Tumortargeting* zytotoxischer Effektorzellen ist auch durch Genmodifikation mit tumorspezifischen Rezeptoren möglich (Abbildung 7). Im Gegensatz zu bispezifischen Antikörpern wird die Tumorerkennung direkt mit den Effektorzellen gekoppelt. Die Transfektion des hepatischen Asialoglykoproteinrezeptors (Lodish, 1991) in die NK-Zelllinie YT führte zu einer besseren Bindung an Tumorzellen mit terminalen β 1-Galaktosylresten auf ihrer Oberfläche. Die Zytotoxizität erhöhte sich jedoch nur gegenüber den Tumorzellen, die schon durch die untransfizierten YT-Zellen lysiert wurden (Schirrmann und Pecher, 2001). Deshalb erfordert ein effektives *Targeting* der YT-Zellen Rezeptorkonstrukte, die ihre Erkennungseigenschaften über eine Signaldomäne an die zytotoxischen Eigenschaften der Effektorzellen koppeln.

1.7.2 Rekombinante T-Zellrezeptoren für das Targeting von NK-Zellen

Rekombinante T-Zellrezeptoren aus einer tumorspezifischen Bindungsdomäne und einer Signalkette, wie der CD3 ζ -Kette oder der Fc-Rezeptor- γ -Kette, ermöglichen das *Targeting* von T-Zellen (Calogero et al., 2000; Eshhar et al., 1993). Mit chimären CD4- ζ -Genkonstrukten konnten neben T-Zellen auch NK-Zellen spezifisch gegen gp120⁺ Zellen abgerichtet werden (Roberts et al., 1998; Roberts et al., 1994; Tran et al., 1995).

Chimäre Immunglobulin-T-Zellrezeptoren (cIgTCRs, Abbildung 8), die auch als „*T-Bodies*“ bezeichnet werden, sind eine besondere Gruppe rekombinanter TCRs, die die Antigenbindungseigenschaften von Antikörpern mit den Signaleigenschaften des TCR-Komplexes verbinden (Eshhar, 1997; Eshhar et al., 1996). Sie sind für ein *Tumortargeting* von NK-Zellen prädestiniert, da sich die Erkennungseigenschaften von Antikörpern mit den Effektoreigenschaften der NK-Zellen hervorragend ergänzen. Antikörper erkennen ihre Antigene MHC-unabhängig. Ihre Antigenerkennung ist deshalb unempfindlich gegenüber der Herabregulation von MHC-Molekülen auf Tumoren und nicht auf einen bestimmten MHC-Typ der Patienten beschränkt. Die MHC-Unabhängigkeit ist ein wichtiges Merkmal der NK-Zellzytotoxizität, und NK-Zellen nutzen die Antikörpererkennung beim ADCC. Antikörper können außerdem hohe Bindungsaffinitäten gegenüber ihrem Antigen vermitteln und erfordern keine Korezeptoren.

Chimäre Rezeptorkonstrukte mit einer TCR-basierten Bindungsdomäne (Willemsen et al., 2000) sind dagegen für ein *Tumortargeting* von NK-Zellen weniger geeignet. Die

Antigenerkennung der α/β -TCRs erfordert die Präsentation eines Peptidantigens im Kontext von MHC-Molekülen, deren Expression inhibitorisch auf NK-Zellen wirken kann (Malnati et al., 1995). Außerdem binden α/β -TCRs an die MHC-Peptid-Komplexe mit geringerer Affinität und benötigen die Hilfe der Korezeptoren CD4 oder CD8, die auf der NK-Zelllinie YT nicht exprimiert sind (Yodoi et al., 1985). Ein weiterer Nachteil ist die geringe Zahl bekannter tumorspezifischer TCR-Sequenzen. Im Gegensatz dazu sind Antikörper gegen viele Tumorantigene etabliert, und es existieren effiziente Methoden für ihre Isolation. Es wurden sogar Fab'-Fragmente erzeugt, die das Peptid eines intrazellulären Antigens im MHC-Kontext erkennen (Willemsen et al., 2001).

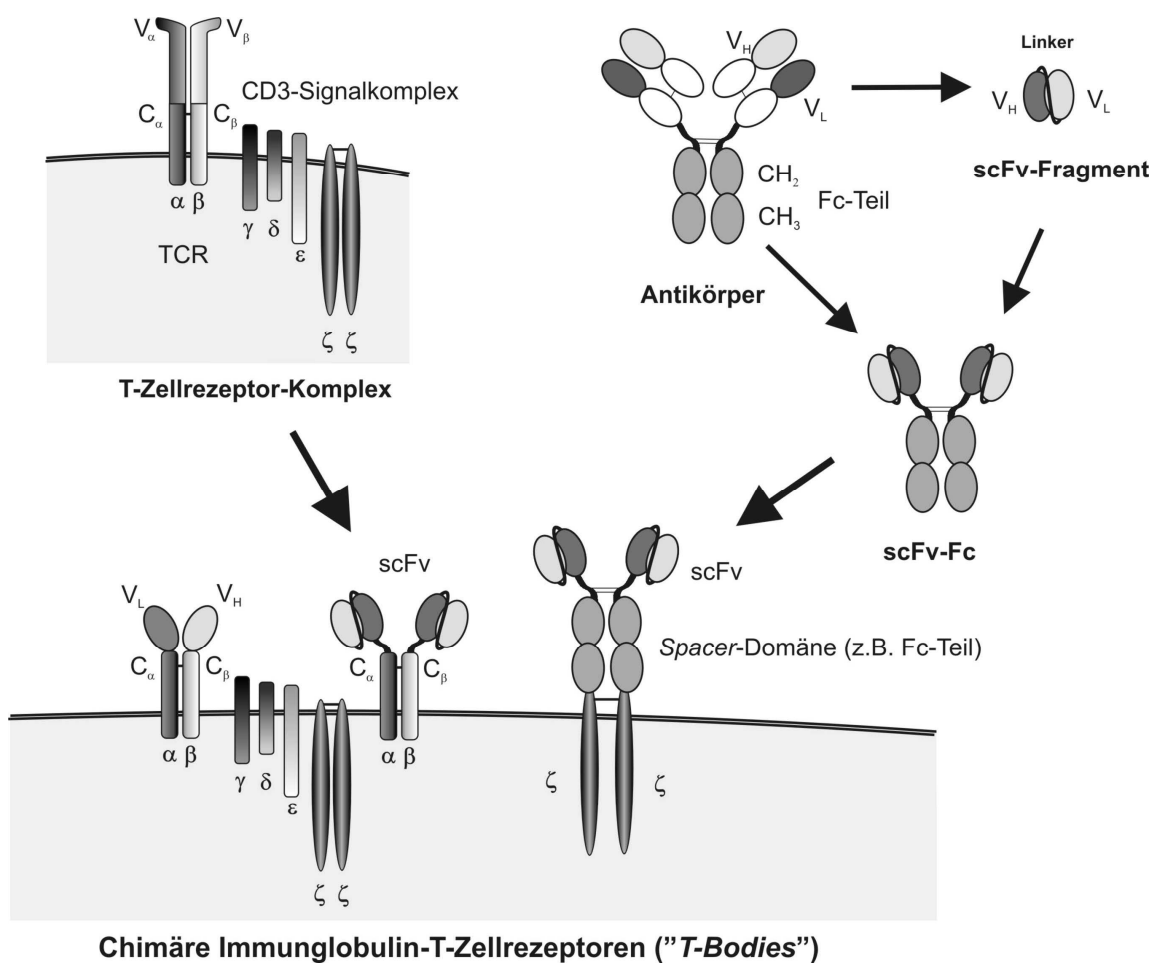


Abbildung 8 - Strategien zur Herstellung von clgTCR-Konstrukten

„T-Bodies“ werden aus den Antigenbindungsdomänen von Antikörpern und den Signalkomponenten des TCR-Komplexes konstruiert. Der Austausch der V-Regionen im TCR durch Antikörper-V-Regionen oder scFv-Fragmente erfordert die Expression von zwei Rezeptoruntereinheiten und die Assemblierung mit dem Signalkomplex des TCRs (unten links), so daß diese Strategie auf T-Zellen beschränkt ist. Einzelsträngige Rezeptorgenkonstrukte aus einem scFv-Fragment und einer Signalkette (unten rechts) können dagegen auch in anderen Immunzellen funktionell exprimiert werden. Häufig werden extrazelluläre „Spacer“-Domänen zwischen scFv-Fragment und Signalkette eingefügt.

1.7.3 Targeting von Lymphozyten mit rekombinanten TCR-Konstrukten

„*T-Bodies*“, die durch Austausch der V-Regionen in den α/β -TCR-Ketten mit den V-Regionen der Antikörperketten konstruiert werden (Goverman et al., 1990; Gross et al., 1989) und mit den Signalkomponenten der TCR-Komplexes assemblieren müssen, sind nur in T-Zellen einsetzbar. Einzelsträngige cIgTCRs aus scFv-Fragment und Signalkette können dagegen auch in NK-Zellen exprimiert werden und erfordern die Transfektion nur eines Genkonstrukts. Zwischen scFv-Fragment und Signalkette werden häufig extraplasmatische „*Spacer*“-Domänen eingefügt, die die Expression, aber auch die Bindungs- und Signaleigenschaften der cIgTCR-Konstrukte unterstützen. In Tabelle 6 sind Beispiele für das *Targeting* von T- und NK-Zellen durch cIgTCR-Gentransfer angegeben.

Tabelle 6 - *Targeting* von Effektorzellen mit chimären Rezeptorgenen

Effektorzelltyp	Spezifität	Anmerkungen	Referenz
Maus-CTL-Hybridom MD45 (BALB/c)	2,4,6-Trinitrophenol (TNP)	TCR-V α /V β durch Antikörper-V $_L$ /V $_H$ ersetzt	(Gorochov et al., 1992; Gross et al., 1989)
MD45	TNP	<i>single-chain</i> -Design (scFv- γ)	(Eshhar et al., 1993)
humane CD8 ⁺ TILs	Folat-bindendes Protein (FBP), TNP	scFv- γ	(Hwu et al., 1993a)
MD45	Neu/HER2		(Stancovski et al., 1993)
Maus-CTL-Linie C196 (C57/BL6)	ErbB2	scFv- <i>hinge</i> - ζ , Lokalisation der genmodifizierten CTL im Tumor (<i>Nude</i> -Maus)	(Moritz et al., 1994)
C196, Jurkat	ErbB2	scFv- <i>hinge</i> - ζ , „ <i>Spacer</i> “-Domäne notwendig	(Moritz et al., 1994)
humane CTL	gp120 (HIV)	chimärer CD4- ζ -Rezeptor	(Roberts et al., 1994)
NK3.3-Klon	gp120 (HIV)	CD4- ζ funktioniert auch in NK-Zellen	(Tran et al., 1995)
Maus-CD8 ⁺ TILs	TNP, FBP	<i>in vivo</i> -Modell	(Hwu et al., 1995)
T-Zellen/Zelllinien (Maus, Ratte)	ErbB2, -3, -4	Optimierung des retroviralen Rezeptorgentransfers in T-Zellen	(Altenschmidt et al., 1996)
humane CTL	G250	scFv- γ , hohes Effektor- <i>Recycling</i>	(Weijters et al., 1996)
Maus-CTL-Hybridom 27J	TNP	scFv-Syk, Syk fördert CBL-, aber nicht PLC γ -Phosphorylierung	(Fitzer Attas et al., 1997)
MD45	TAG72 (B72.3)	scFv- γ , keine Expression von scFv- ζ	(Hombach et al., 1997)
Maus-T-Zellen	ErbB2 (FRP5)	scFv- ζ , syngenes Maustumormodell, totale Tumoregression, keine Antikörper gegen genmodifizierte T-Zellen	(Altenschmidt et al., 1997)
Maus-CTL-Hybridom 27J	Kollagen-II (C2)	scFv- γ /CD3 ζ -Heterodimere reduzieren Ag-Antwort und endogene ζ -Expression	(Annenkov et al., 1998)
	TNP	Syk liefert besseres Signal als ZAP70, TM-Domänen von CD4 und CD8 wirken ähnlich	(Fitzer Attas et al., 1998)
MD45	CD30 (HRS3)	γ -Kette, lösliches CD30 inhibiert nicht	(Hombach et al., 1998a)
MD45	TAG72 (CC49)	scFv-Fc- γ oder - ζ	(Hombach et al., 1998b)
häm. Stammzellen, CD34 ⁺ Vorläufer	gp120 (HIV)	CD4- ζ , Differenzierung zu transgenen NK-Zellen und Neutrophilen	(Roberts et al., 1998)

Effektorzelltyp	Spezifität	Anmerkungen	Referenz
humane CTL	G250	STITCH-Vektorsystem, verschiedene clgTCRs	(Weijtens et al., 1998a)
humane T-Zellen	G250 (Nierenkarzinom)	scFv-Fc- γ , hohe clgTCR-Expression und Adhäsionsmoleküle unterstützen Lyse	(Weijtens et al., 1998b)
humane T-Zellen	gp120 (HIV)		(Patel et al., 1999)
MD45	CEA	scFv-Fc- γ , lösliches CEA hemmt nicht	(Hombach et al., 1999)
MD45	HMW-MAA (Melanoma)		(Reinhold et al., 1999)
humane T-Zellen	CEA	scFv- ζ , Fab'- ζ , scFv- ϵ und Fab'- ϵ	(Nolan et al., 1999)
MD45	ErbB2	Fas-vermittelte Lyse	(Haynes et al., 1999)
humane T-Zellen	TAG72 (Mucin-Ag, Adenokarzinome)	humaner Antikörper CC49, ζ -Kette, kein „Bystander-Killing“, Xenograft-Mausmodell	(McGuinness et al., 1999)
Maus-T-Zellen	EGP40 (Kolonkarzinome)		(Daly et al., 2000)
clgTCR-transgene Mäuse		IL-2-Stimulation notwendig	(Brocker, 2000)
humane T-Zellen	melanomspez. TCR, HLA-A1	chimäre <i>single</i> - und <i>two-chain</i> TCRs (C β 1-Domäne stabilisiert V-Domänen)	(Willemsen et al., 2000)
humane T-Zellen	TAG72, CEA, HIV-Hüllproteinepitope	bispezifische clgTCRs, breitere Spezifität gegen den Verlust einzelner Antigenepitope	(Patel et al., 2000)
humane T-Zellen	G250	hohe clgTCR-Expression ermöglicht Lyse auch bei geringer Antigenexpression	(Weijtens et al., 2000)
humane T-Zellen	CEA	scFv-Fc- ζ	(Hombach et al., 2000b)
humane T-Zellen	EGP-2	scFv- <i>hinge</i> - γ besser als scFv- γ	(Ren Heidenreich et al., 2000)
syngene humane T-Zellen	gp120 (HIV)	CD4- ζ , klinische Studie an Zwillingsspaar	(Walker et al., 2000b)
humane T-Zellen	GD3 (Gangliosid)	keine Hemmung durch 100 μ g/mL GD3	(Yun et al., 2000)
humane T-Zellen	CEA		(Beecham et al., 2000)
humane T-Zellen	TNP	scFv- <i>hinge</i> -CD28- γ	(Eshhar et al., 2001)
CD4 ⁺ T-Zellen	CEA, CD30		(Hombach et al., 2001a)
autologe PBL	CD30	Überwindung der Toleranz gegen autologes T-Zellymphom (<i>in vitro</i>)	(Hombach et al., 2001b)
PBL	CEA, CD30	CD28-Kostimulation beeinflusst IL-2-Sekretion, aber nicht IFN- γ -Sekretion, Zellproliferation und Zytotoxizität	(Hombach et al., 2001c)
MD45	CEA	ζ -Kette liefert stärkeres Signal als γ -Kette	(Haynes et al., 2001)
EBV-spez. T-Zellen	CD19	duale Spezifität gegen EBV und CD19	(Roessig et al., 2002)
Maus-T-Zellen	CEA	scFv-CD28- ζ , kostimulatorisches Signal durch clgTCR, erhöhte IFN- γ -Produktion, syn- und xenogenes Maustumormodell	(Haynes et al., 2002a; Haynes et al., 2002b)
humane T-Zellen	EGP-2	scFv- <i>hinge</i> - γ und scFv- <i>hinge</i> - ζ vergleichbar, keine Kostimulation notwendig	(Ren-Heidenreich et al., 2002)
humane T-Zellen	CEA	scFv- <i>hinge</i> -CD28- ζ	(Arakawa et al., 2002)
NK92-Zelllinie	ErbB2	<i>Targeting</i> einer humanen NK-Zelllinie	(Uherek et al., 2002)

2 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation untersucht die genetische Modifikation der humanen Natürlichen Killer-(NK)-Zelllinie YT mit tumorspezifischen Rezeptorkonstrukten zur Erweiterung ihrer zytotoxischen Eigenschaften. Im Rahmen dieser Aufgabenstellung werden chimäre Rezeptoren mit den Erkennungseigenschaften tumorspezifischer Antikörper konstruiert und in die YT-Zelllinie transfiziert. Die rezeptorgenmodifizierten YT-Zellen sollen auf ihre Wirkung gegenüber Tumorzellen untersucht werden.

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Konstruktion von chimären Rezeptorgenen, die ein „*Tumortargeting*“ der NK-Zelllinie YT ermöglichen. Die Bindungsdomänen der Rezeptoren werden als *single-chain*-Antikörper-Fragmente aus den humanisierten variablen Regionen des CEA-spezifischen Antikörpers BW431/26 und des CD33-spezifischen Antikörpers HuM195 erzeugt. Die scFv-Konstrukte sollen auf ihre Bindungseigenschaften überprüft und zur Färbung von Tumorzellen eingesetzt werden. Um die Antigenerkennung dieser scFv-Fragmente mit den Effektoreigenschaften der NK-Zelllinie YT zu koppeln, werden sie mit der CD3 ζ -Signalkette zu chimären Rezeptorgenkonstrukten fusioniert. Außerdem soll ein Kontrollrezeptorkonstrukt, das keine zellulären Antigene erkennt, erzeugt werden.

Die NK-Zelllinie YT soll mit diesen Rezeptorgenen durch Elektroporation transfiziert und geeignete Verfahren zur Selektion und Anreicherung der transgenen NK-Zellen evaluiert werden. Die genmodifizierten YT-Zellen werden *in vitro* auf ihre Zytotoxizität gegenüber Tumorzelllinien getestet. Dabei soll die Relevanz von zirkulierendem Antigen untersucht werden. Für einen sicheren klinischen Einsatz von Effektorzelllinien im Patienten muß ihr Wachstum beschränkt werden. Zu diesem Zweck sollen die rezeptorgenmodifizierten YT-Zellen bestrahlt und ihr Wachstum sowie ihre zytotoxischen Eigenschaften nach γ -Bestrahlung untersucht werden. Die Wirksamkeit der bestrahlten rezeptortransfizierten YT-Zellen gegenüber Tumoren soll *in vivo* in einem NOD/SCID-Mausmodell überprüft werden. Da die Wirkung adoptiv transferierter Effektorzellen von einer Abstoßung durch das Immunsystem des Patienten abhängt, sollen die YT-Zellen vor und nach Rezeptorgentransfer auf ihre Sensibilität gegenüber allophenen Blutlymphozyten *in vitro* untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen klären helfen, ob sich ein „*Tumortargeting*“ der humanen NK-Zelllinie YT durch den Gentransfer tumorspezifischer chimärer Rezeptorkonstrukte erreichen läßt und ob ein Potential für den Einsatz rezeptorgenmodifizierter YT-Zellen zur adoptiven Immuntherapie von Tumorerkrankungen besteht.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine Geräte

– CO ₂ -Inkubator, Labotect	Labor-Technik-Göttingen
– Sterilbank, Variolab Mobilien W90	Waldner-Laboreinrichtungen GmbH
– temperierbares Wasserbad	Memmert
– Heraeus Megafuge 3.0R, inkl. Schwing-Rotor und Einsätze für Mikrotiterplatten	Heraeus, Kendro
– Biofuge 15	Heraeus, Kendro
– N ₂ -Container, K-Series	Harsco Taylor-Wharton
– <i>Ultralow Freezer</i> (-80°C)	Sanyo
– 37°C-Schrank (aus dem Bestand der Akademie der Wissenschaften der DDR)	
– FACSort [®] , FACScan [®]	Becton Dickinson
– temperierbarer Schüttler	Brunswick

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zelllinien

– 293T	M. Seidensticker, Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin (MDC), Berlin	
– Capan2	ATCC HTB-80, <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC), Rockville, MD, USA	
– HL60	ATCC CCL-240	
– HT29	ATCC HTB-38	
– KG1	U. Karsten, MDC Berlin (Thomsen-Friedenreich Antigen negative Sublinie)	
– LoVo	ATCC, CCL-229	
– LS174T	ATCC, CL-188	
– MC38, MC32A	J. Schlom (<i>National Cancer Institute</i> (NIH), Bethesda, MD, USA)	
– Panc89	J. Kopp, Robert-Rössle-Klinik der Charité, Berlin	
– Reh	G. Moldenhauer (Virchow-Klinikum der Humboldt-Universität zu Berlin)	
– SW1222	V. Brinkmann (MDC)	
– SW1417	ATCC CCL-238	
– SW403	ATCC CCL-230	
– SW480	ATCC CCL-228, W. Kemmner, MDC, Berlin	
– SW948	ATCC, CCL-237	
– YT	J. Yodoi, Institut für Virus-Forschung, Kyoto, Japan	
– RPMI-1640 (RPMI)		Biowhittaker
– DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>)		Biowhittaker
– fetales Kälberserum (FCS) (500 mL-Flasche 1 h bei 56°C hitzeinaktivieren.)		Gibco
– Gentamicin (Stammlösung 50 mg/mL)		Biowhittaker

- | | |
|---|---------------------|
| – Trypsin-Versene™ (1000 U/mL Trypsin und 0,2% EDTA in PBS) | Biowhittaker, Gibco |
| – sterile Gewebekulturflaschen und -platten und serologische Pipetten | TPP, Nunc, Greiner |
| – sterile Polypropylenröhrchen (50 mL, 15 mL) | TPP |

Zellkulturmedien: – RPMI / 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS / 50 µg/mL Gentamicin
– DMEM / 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS / 50 µg/mL Gentamicin

Die Zellen und Zelllinien wurden bei 37°C (5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die humane NK-Zelllinie YT und die humanen Leukämiezelllinien KG1, HL60 und Reh wurden in RPMI / 10% FCS / 50 µg/mL Gentamicin kultiviert. Die humanen Kolonkarzinomzelllinien HT29, LoVo, LS174T SW403, SW480, SW948, SW1222 und SW1417, die humanen Pankreaskarzinomzelllinien Capan2 und Panc89, die transformierte humane embryonale Nierenzelllinie 293T und die Maus-Kolonkarzinomzelllinien MC38 und MC32A wurden in DMEM / 10% FCS / 50 µg/mL Gentamicin kultiviert. Die adhärent wachsenden Tumorzelllinien wurden mit Trypsin-Versene™ abgelöst. Die Zellen wurden i. A. mit 1000 – 1200 U/min (200 – 300xg) bei 4°C in einer Megafuge 3.0R mit Schwingrotor zentrifugiert.

Die MC32A-Zellen sind aus der Zelllinie MC38 durch Transfektion mit der cDNA des humanen CEA erzeugt worden (Fox et al., 1990) und wurden durch „*limited dilution*“ kloniert. Die Zellen wurden hierfür in einer Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen (*wells*) und flachem Boden auf 3, 1 und 0,3 Zellen/*well* verdünnt. Nach etwa 14 Tagen wurden die Klone in 6-*well*-Gewebekulturschalen umgesetzt und nach einer weiteren Woche auf die Expression von CEA analysiert.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

- | | |
|---|-------------|
| – <i>Cryo-1C-Freezing-Container</i> (nach 5-maliger Verwendung Isopropanol austauschen) | Nunc, NALGE |
| – 1 mL- oder 2 mL- <i>Cryo</i> -Röhrchen | Nunc |
| – DMSO (Hybri-Max™, Zellkulturgrad) | Sigma |

Auftaumedium: DMEM / 40% (v/v) FCS

Einfriermedium: DMEM / 40% (v/v) FCS / 20% (v/v) DMSO

Die Zellen wurden vor dem Einfrieren einmal gewaschen und in kaltem DMEM / 40% FCS mit einer Zellkonzentration von 2 – 20 x 10⁶ Zellen/mL resuspendiert. Unter Schütteln wurde schrittweise ein Volumen kaltes DMSO-haltiges Einfriermedium zugegeben. Zwischen den Schritten wurde die Zellsuspension 1 min auf Eis inkubiert. Durch diese Prozedur wurde die DMSO-Konzentration langsam auf 5 – 10% (v/v) erhöht. Die Zellsuspension wurde in Einfrier Röhrchen aliquotiert und in einen 4°C-kalten *Cryo-1C-Freezing-Container* gestellt, der für mindestens 4 h bei -80°C (ca. -1 K/min) deponiert wurde. Langfristig wurden die Zellen in flüssigem N₂ (-192°C) gelagert.

Die Kryokonserven wurden in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut, sofort in ein 15 mL-Polypropylenröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Umgekehrt zur Einfrierprozedur wurde durch schrittweise Zugabe von Auftaumedium (Beginn mit 1/10 Volumen) die DMSO-Konzentration auf unter 1% (v/v) verdünnt. Die Zellen wurden anschließend 10 min bei 700 U/min (4°C) abzentrifugiert und in ihrem Kulturmedium resuspendiert. Die Selektionsbedingungen für transfizierte Zellen wurden erst 24 h nach dem Auftauen wieder aufgenommen.

3.2.3 Isolation von humanen peripheren Blutlymphozyten

- | | |
|--|----------------------|
| – gepooltes humanes AB-Serum (Hitzeinaktivierung 45 min bei 52°C) | Biowhittaker |
| – Liquemin [®] N 25000 (Heparin) | Hoffmann-La Roche AG |
| – Lymphoprep [™] (1,077 g/mL bei 20°C) | Nycomed Pharma AG |
| – Optiprep [™] (Stammlösung 1,320 g/mL bei 20°C) | Nycomed Pharma AG |
| – IMDM (<i>Iscove's modified Dulbecco's modified Eagle's medium</i>) | Biowhittaker |
| – Ultrasaline A (HEPES gepufferte Saline) | Biowhittaker |

Medien:

- IMDM / 10% (v/v) AB-Serum
- RPMI / 10% (v/v) AB-Serum / 50 µg/mL Gentamicin

Optiprep[™] 1,063 g/mL (20°C): – Optiprep mit Ultrasaline A und einem Dichte-Aerometer auf 1,063 g/mL (20°C) einstellen und sterilfiltrieren

50 mL Blut wurden von den Probanden mit einer heparinisierten (100 IE/mL Heparin) 50 mL-Spritze (Braun) abgenommen. Das heparinisierte Vollblut wurde mit einem Volumen RPMI (RT) gemischt und auf einen Lymphoprep[™]-Dichtegradienten (1,077 g/mL, 20°C) aufgetragen. Die Zentrifugation wurde 30 min bei 1600 U/min (20°C) und abgeschalteter Bremse durchgeführt. Die weiß-gelbliche Schicht aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und Thrombozyten wurde abgenommen, mit einem Volumen RPMI gemischt und 12 min bei 1300 U/min (20°C) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 7 mL RPMI resuspendiert und auf 7 mL Optiprep[™] 1.063 g/mL (20°C) aufgeschichtet. Die Zentrifugation wurde 15 min mit 1300 U/min (20°C) durchgeführt. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet 1x mit kaltem RPMI gewaschen (15 min, 1000 U/min, 4°C). Wenn der Anteil an Thrombozyten > 10% war, wurden die Zellen 2x mit RPMI gewaschen. 5 x 10⁶ PBMC je mL wurden in IMDM / 10% AB-Serum resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (75 cm² bei 5 – 10 x 10⁷ PBMC) überführt. Die Monozytenadhärenz wurde über Nacht in einem CO₂-Inkubator bei 37°C durchgeführt. Die nichtadhärenten PBL wurden abgenommen und mit einer Konzentration von 10⁶ Zellen/mL in RPMI / 10% AB-Serum / 50 µg/mL Gentamicin in Kultur genommen.

3.2.4 Kalziumphosphattransfektion der 293T-Zellen

dH₂O (für Zellkultur)

2,5 M CaCl₂ (steril)

2x HeBSP-Buffer:	– 10 g/L HEPES (Pufferan [®])	Roth
	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat)	
	– 0,31 g/L Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Serva
	– 16 g/L NaCl	Sigma
	– 0,74 g/L KCl	Serva
	– 2 g/L Glukose	Sigma
	– pH 6,95-6,97 (Der pH-Wert ist ein kritischer Parameter!)	
	– durch 0.2 µm Celluloseacetat-(CA)-Filter sterilfiltrieren	

Die 293T-Zellen wurden entsprechend Tabelle 7 am Vortag eingesät, um am folgenden Tag eine Konfluenz von 50 – 75% zu erreichen. 4 h vor Transfektion wurde das Kulturmedium durch frisches vorgewärmtes Medium ersetzt. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden auf RT temperiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Tabelle 7 in 250 mM CaCl₂ verdünnt. Der 2x HeBSP-Puffer wurde

tropfenweise hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Die Suspension wurde 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und unter leichtem Schwenken der Schalen mit dem Kulturmedium vermischt. Die Zellen wurden mit dem Präzipitat 12 – 24 h inkubiert (5% CO₂, 37°C). Das Medium wurde im Anschluß komplett ausgetauscht.

Tabelle 7 - Kalziumphosphattransfektionsansätze

Gewebekulturschale	Ø 30 mm	Ø 60 mm	Ø 150 mm
293T-Zellen (am Vortag eingesät)	2 x 10 ⁵	8 x 10 ⁵	2 – 4 x 10 ⁶
Kulturvolumen (DMEM/ 10% FCS/ Gentamicin)	3 mL	6 mL	50 mL
DNA	1 – 2 µg	4 – 10 µg	25 – 50 µg
2,5 M CaCl₂	12,5 µL	25 µL	125 µL
dH₂O	auf 125 µL	auf 250 µL	auf 1,25 mL
+ 2x HeBSP	125 µL	250 µL	1,25 mL

3.3 Antikörperfärbungen

Tabelle 8 – Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Allotyp, Stamm, Klon	Isotyp	
<i>CD3-FITC, -PE</i>	Maus, BALB/c, UCHT-1	IgG1	Immunotech/ Coulter
<i>CD3 ζ-Kette</i>	Maus, 1D4	IgG1	Pharmingen/ Becton Dickinson
<i>CD16-FITC</i>	Maus, BALB/c, 3G8	IgG1	Immunotech/ Coulter
<i>CD33-FITC</i>	Maus, WM54	IgG1	Dako
<i>CD56-PE</i>	Maus, B159	IgG1κ	Pharmingen
<i>CD66e</i>	Maus, CEJ065	IgG1	Immunotech/ Coulter
<i>CD80-FITC</i>	Maus, BALB/c, MAB104	IgG1	Immunotech/ Coulter
<i>CD86-PE</i>	Maus, BALB/c, 2331 (FUN-1)	IgG1	Immunotech/ Coulter
<i>c-myc-Tag</i>	Maus, 9E10	IgG1	Sigma
<i>HLA-ABC-FITC</i>	Maus, BALB/c, B9.12.1	IgG2aκ	Immunotech/ Coulter
<i>HLA-DR-FITC, -PE</i>	Maus, BALB/c, B8.12.2	IgG2bκ	Immunotech/ Coulter

Isotypenkontrollen	Allotyp, Stamm	Isotyp	
<i>IgG1-FITC, -PE</i>	Maus, BALB/c	IgG1κ	Immunotech/ Coulter
<i>IgG1κ</i>	Maus, BALB/c	IgG1κ	Immunotech/ Coulter
<i>IgG2aκ-PE</i>	Maus	IgG2aκ-PE	Immunotech/ Coulter
<i>IgG2bκ-PE</i>	Maus	IgG2bκ-PE	Immunotech/ Coulter

Sekundärantikörper	Allotyp	
<i>Anti-Maus-IgG(H+L)-F(ab')₂-Fragment (FITC- oder AP-konjugiert)</i>	Ziege oder Ratte	Dianova/ Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc.
<i>Anti-human-Fcγ-F(ab')₂-Fragment (FITC- oder HRPo-konjugiert)</i>	Ziege (adsorbiert gegen Maus, Rind und Pferd)	Dianova/ Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc.

3.3.1 Durchflußzytometrische Analyse von Oberflächenmarkern

– 0,6 mL-Röhrchen, 96- <i>well</i> -Mikrotiterplatte (Spitzboden)	Greiner
– 6 ml-Röhrchen (Andere Röhrchen passen u. U. <u>nicht</u> an das FACS-Gerät!)	Falcon (Becton Dickinson)
– Propidiumiodid (PI), NaN ₃ , BSA (<i>bovine serum albumin</i> , Fraktion V)	Sigma
– FACS-Flow™, -Rinse™ und Safe™	Becton Dickinson
– PBS (<i>Phosphate buffered Saline</i>)	GIBCO
– Kaninchenserum (Hitzeinaktivierung, 5x Gefrier-Auftau-Zyklen zur Bildung von Immunkomplexen, 1:10 in FACS-Puffer verdünnen)	Biowhittaker

FACS-Puffer:

- PBS
- 0,5% (w/v) BSA
- 0,1% NaN₃

2x PI-Puffer: – FACS-Puffer mit 2 µg/mL PI

5 x 10⁴ – 5 x 10⁵ Zellen/Ansatz wurden in 96-*well*-Spitzboden-Mikrotiterplatten übertragen und mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1200 U/min, 4°C). Die Zellen wurden mit 10 µL 1:10 Kaninchenserum geblockt (15 min, 4°C). Anschließend wurde 10 µL Antikörper je Ansatz zugegeben und 15 min bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit FACS-Puffer gewaschen. Bei ungelabelten Primärantikörpern wurde eine zweite Färbung mit einem Fluorochrom-konjugierten Zweitantikörper angeschlossen. Die gefärbten Zellen wurden in 200 µL FACS-Puffer resuspendiert und in 0,6 mL-FACS-Röhrchen überführt. Ein Volumen 2x PI-Puffer wurde zugegeben. Die Messung wurde an einem FACSort® oder FACScan® mit der Software Cellquest® 3.0 (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Cellquest® 3.0 oder WinMDI2.8 (<http://facs.scripps.edu>) unter Ausschluß des Zellschrotts (SSC-FSC-Plot) und der PI-gefärbten toten Zellen (FL-3).

3.3.2 Intrazelluläre FACS-Analyse

– Formalin (ca. 37% Formaldehyd)	Sigma
– Saponin	Sigma
4% (v/v) Formaldehyd / PBS:	– 10,8 mL Formalin auf 100 mL mit PBS auffüllen
FACS-Puffer:	– siehe 3.2.4
Saponinpuffer:	– 0,5% (w/v) Saponin in FACS-Puffer

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und 2 x 10⁶ Zellen/mL in PBS resuspendiert. Nach Zugabe von einem Volumen 4% Formaldehyd / PBS wurden die Zellen 20 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, um das Formaldehyd vollständig zu entfernen. Alle Zentrifugationen nach der Fixierung wurden mit 1400 U/min durchgeführt, um ein festeres Zellpellet zu erhalten. Saponin ist ein Detergenz, das in der Zellmembran reversibel ca. 8 nm große Poren bildet, die bis zu 200 kDa große Moleküle, z. B. Antikörper (150 kDa), passieren können. 2 x 10⁵ Zellen je Ansatz wurden in Saponinpuffer resuspendiert und 1x gewaschen. Die Antikörperfärbungen wurden in 30 – 50 µL Volumen Saponinpuffer bei RT durchgeführt. Erstantikörper wurden 60 min und Zweitantikörper 30 min bei RT inkubiert. Nach jeder Inkubation wurden die Zellen mit Saponinpuffer gewaschen und in 1 mL Saponinpuffer 30 min bei RT inkubiert, damit ungebundener Antikörper aus

den Zellen herausdiffundiert. Am Ende wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen übertragen (ohne 2x PI-Puffer, da Zellen fixiert sind). Da sich die Poren nach Entfernen des Saponins in proteinhaltigen Medium wieder schließen, können im Anschluß noch Färbungen von Oberflächenmarkern durchgeführt werden (Assenmacher, 1992). Die Eignung der Antikörper für intrazelluläre Färbungen und die einzusetzenden Konzentrationen wurden ausgetestet.

3.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.4.1 Bakterienkultur

E. coli-Stämme

- | | |
|--|---------------------|
| – XL1-Blue (<i>recA1 endA1 gyr96 (Naf^r) thi-1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) glnV44(=supE44) relA1 lac [F' lacI^r Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺ Tn10 (Tet^r)</i>]), K12-Stamm | Stratagene |
| – Top-10F' (vergleichbar mit XL1-Blue, aus dem T/A-Cloning Kit) | Invitrogen |
| – DH5α-F' (<i>F'</i> <i>recA1 endA1 gyr96 (Naf^r) thi-1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) glnV44 (=supE44) relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR (φ80 dlac Δ(lacZ)M15)</i>), K12-Stamm | GIBCO |
| – Erlenmeyerkolben mit Einbuchtungen | Faust |
| – Select TM -Pepton, -Hefeextrakt und -Agar | GIBCO |
| – Ampicillin | Boehringer Mannheim |
| – NaCl, NaOH | Serva, Roth |
| – 45% Glukose in PBS (sterilfiltriert) | Sigma |
| – Petrischalen | Greiner |

LB-Medium: – 10 g/L SelectTM-Pepton
(Luria-Bertani) – 5 g/L SelectTM-Hefeextrakt
– 5 g/L NaCl
– 1 mL 1N NaOH

SOB-Medium: – 2xTY-Medium
– 10 mM MgCl₂
– 10 mM MgSO₄

LB-Platten: – LB-Medium
– 15 g/L SelectTM-Agar

2xTY-Medium: – 16 g/L SelectTM-Pepton
– 10 g/L SelectTM-Hefe-extrakt
– 5 g/L NaCl

SOC-Medium: – SOB-Medium
– 20 mM Glukose (sterilfiltriert)

In dieser Arbeit wurden die E. coli-Stämme Top-10F', XL1-Blue und DH5α-F' verwendet. Diese *recA*⁻ Stämme sind für die Präparation von Plasmiden geeignet. Der Stamm XL1-Blue wurde aufgrund seiner *lacI^r*-Mutation auch zur Konstruktion und Expression der scFv-Fragmente in eingesetzt. Die Bakterien wurden in LB- oder 2xTY-Medium angeschüttelt (200 – 240 U/min, 37°C) und auf LB-Platten ausgestrichen. Das Antibiotikum Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg/mL zur Selektion eingesetzt. Bakterienstocks wurden aus einer logarithmisch wachsenden Bakteriensuspension durch Zugabe von einem Volumen 50%iger Glycerollösung in LB oder 2xTY hergestellt und bei -80°C gelagert.

Chemisch kompetente E. coli-Zellen wurden mit der RbCl-Methode (modifiziert nach Hanahan, 1985) durchgeführt. Eine genaue Beschreibung ist im „*Protocols and Applications Guide*“ (Promega, 3rd Edition, P1610) zu finden. 1 – 50 ng Plasmid-DNA bzw. 5 – 10 µL eines Ligationsansatzes wurden in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß auf Eis vorgelegt. 100 µL kompetente Zellen wurden im Eisbad aufgetaut und zur DNA pipettiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz einem Hitzeschock von 45 – 60 s in einem 42°C-warmen Wasserbad unterzogen und danach für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 mL SOC-Medium (ohne Antibiotika) wurden die Zellen 45 – 60 min bei 37°C mit 225 U/min geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit Antibiotikum (100 µg/mL Ampicillin) ausgestrichen. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4.2 Allgemeine Methoden bei der DNA-Klonierung

– Agarose (Elektrophoresegrad)	Serva, Biozym
– Borsäure, Tris-Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Trizma®), Tris-HCl	Sigma
– Chloroform	Roth
– Eisessigsäure (<i>glacial acetic acid</i>)	Sigma, Roth
– Ethidiumbromid (10mg/mL)	Gibco
– Harnstoff (<i>urea</i>)	GIBCO
– Isopropanol, Ethanol	Roth
– Maxi-DNA-Prep (QIA-Tip 500)	Qiagen
– Maxi-DNA-Prep (Maxi-Pure-Prep)	GIBCO
– Minigel-, Maxigelapparatur und Powerpack P25	Biometra
– QIAexII <i>Gelextraction</i> Kit, QIAspin-DNA-Prep-Kit	Qiagen
– Xylencyanol, Bromphenolblau (gesättigte Stammlösungen in Ethanol herstellen)	Serva
– Natriumacetat, Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
– 49,5% / 49,5% / 1% (v/v/v) Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol	Roth
– Ethanol	Roth

50x TAE:	– 242 g/L Tris-Base	10x DNA-	– 10 mM TrisHCl
	– 57,1 g/L Eisessigsäure	Ladepuffer:	– 100 mM EDTA
	– 37,1 g/L Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O		– 30% Glycerol (Sigma)
	– pH-Wert nicht nachstellen!!!		– 1% SDS
			– Farbstoffe*

* Die Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau wurden in einer möglichst geringen Konzentration eingesetzt.

Allgemeine Methoden im Umgang mit DNA sind in „Gentechnische Methoden“ (Hrsg. Gassen/Schrimpf, 2. Auflage, Gustav-Fischer Verlag) ausführlich beschrieben. Plasmid-Mini-Präparationen (1 – 5 µg) wurden mit dem QIAspin-DNA-Prep-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Plasmidpräparationen im großen Maßstab für die Transfektion von Zelllinien erfolgten mit Anionenaustauschersäulen (QIA-Tip 500, Maxi-Pure-Prep) nach Herstellerangaben. Zur Analyse von DNA-Präparationen, Restriktionen und PCRs wurden 1 – 2,5%ige Agarosegele mit 1x TAE-Puffer (gleichzeitig Laufpuffer) hergestellt. DNA-Fragmente wurden aus den Agarosegelen mit dem QIAexII *Gelextraction Kit* nach Herstellerangaben extrahiert.

3.4.3 Enzymreaktionen bei der DNA-Klonierung

– Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Fermentas, Amersham
– Y ⁺ /Tango-Universalpuffer	Fermentas
– Uni-Buffer	Stratagene
– 10xBSA (0,1%)	New England Biolabs, Amersham
– NEB-Puffer	New England Biolabs
– SuRECut-Puffer	Boehringer Mannheim
– <i>Shrimps Alkaline Phosphatase</i> (SAP)	Amersham
– T4-Ligase und Reaktionspuffer (mit ATP)	Amersham
– S1-Nuclease (aus <i>Aspergillus oryzae</i>)	Boehringer Mannheim (Roche)

Restriktion

Die DNA wurde mit 10 U Restriktionsenzym je µg DNA bei 37°C (SmaI bei 25°C) für mindestens 1 h inkubiert. Je nach verwendetem Puffer und der daraus resultierenden Aktivität der Enzyme wurden die Enzymmenge und die Inkubationszeit erhöht. Das Reaktionsvolumen wurde mindestens auf das 10-fache der eingesetzten Enzymmenge (insbesondere bei Enzymen mit Staraktivität) angesetzt, um die Glycerolkonzentration im Reaktionsansatz gering zu halten. Bei Ansätzen mit mehreren Enzymen wurde der geeignete Puffer nach Herstellertabellen ausgewählt oder ein Universalpuffer eingesetzt (Y/Tango⁺, Uni-Buffer). Einige Enzyme wurden 10 min bei 75°C hitzeinaktiviert oder mit Phenol / Chloroform extrahiert.

Dephosphorylierung von DNA

Zur Dephosphorylierung von 1 µg Vektor-DNA wurde 1 U SAP eingesetzt und die Reaktion 1 h bei 37°C durchgeführt. Das Enzym wurde anschließend 20 min bei 60°C inaktiviert. Bei Ligationen mit drei Insertionsfragmenten wurde auch das mittlere Fragment dephosphoryliert.

Ligation von DNA

10 – 50 ng dephosphorylierte Vektor-DNA wurden mit der 10-fachen molaren Menge an Insertionsfragmenten ligiert, ohne eine Gesamt-DNA-Menge von 100 ng in einem 20 µL-Ansatz zu übersteigen. Die Ligation wurde nach Zugabe von 1 U T4-Ligase gestartet und über Nacht bei 16°C durchgeführt.

Entfernung überstehender 5'-Enden mit S1-Nuclease

1x S1-Nuclease-	– 20 mM TrisHCl	10x S1-Nuclease-	– 500 mM Natriumacetat
Lagerungspuffer:	– 50 mM NaCl	Reaktionspuffer:	– 10 mM Zinkacetat
	– 1 mM ZnCl ₂		– 2,5 M NaCl
	– 50% (v/v) Glycerol		– 500 µg/mL BSA
	– pH 7,5		– pH 4,6 mit Essigsäure einstellen

Die überstehenden 5'-Enden von DNA-Fragmenten wurden mit der S1-Nuclease entfernt. Dieses Enzym schneidet einzelsträngige DNA, führt aber auch zum Fragmentieren der DNA, insbesondere bei niedrigen Salzkonzentrationen (< 50 mM NaCl). Deshalb wurden Ansätze mit 1, 10 und 100 U S1-Nuclease je µg DNA 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurden die Proben sofort mit 1/100 Volumen 0,5 M EDTA (pH 8.0) abgestoppt und eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

– Thermocycler TRIO-Thermoblock™	Biometra
– Pfu-Polymerase ($t_{\text{Elongation}} = 2 \text{ min/kB}$)	Stratagene, Promega
– CombiPol™-Mix ($t_{\text{Elongation}} = 30 \text{ s/kB}$)	InViTek
– Taq-Polymerase ($t_{\text{Elongation}} = 30 \text{ s/kB}$)	Promega
– dNTPs (2 mM von jedem dNTP)	Fermentas
– Kundenspezifische Primer (50 μM Stammlösung)	Biotez

Die Standard-PCR-Ansätze wurden nach Tabelle 9 angesetzt. Die PCR-Reaktion wurde nach dem beschriebenen Ablauf Tabelle 10 durchgeführt. Die Polymerase wurde nach Denaturierung der DNA in die Ansätze gegeben („Hotstart“). Abweichungen von diesem Standardprotokoll wurden angegeben.

Tabelle 9 - PCR-Mix

– Template-DNA:	0,1 – 100 ng (meistens 1 – 10 ng)
– 10x Reaktionspuffer:	1/10 verdünnen (1x)
– Mg^{2+}	1,5 mM (oder im Puffer enthalten)
– dNTPs	0,1 μM (je dATP, dTTP, dGTP und dCTP)
– Primer 1 und 2	je 0,1 μM
– dH_2O	Endvolumen 50 oder 100 μL
– Zusätze	abhängig vom Enzym (z. B. <i>Enhancer</i>)
– Enzym	1-2,5 U (<i>Hotstart</i>)

Tabelle 10 - Ablauf der Standard-PCR

Schritt	zusätzlich bei <i>Two-Step-PCR</i>		
1. 95°C 5'	Denaturierung		
	Zugabe der Polymerase (Hotstart!)		
2. 94°C 1'	Denaturierung	} Zyklenzahl	
3. $T_{\text{Annealing}}$ 1'	Annealing		
4. 72°C $t_{\text{Elongation}}$	Elongation		
5.		} Zyklenzahl	94°C 1' Denaturierung
6.			$T_{\text{Annealing}}$ 1' Annealing
7.			72°C $t_{\text{Elongation}}$ Elongation
8. 72°C 10 – 30'	Auffüllen der Enden (Taq 10 min; Pfu 30 min)		
9. 4°C ∞			

3.4.5 Isolation der Gesamt-cDNA humaner Blutlymphozyten

Isolation der Total-RNA

- Phytohämagglutinin-L (PHA) Sigma
- Diethylpyrocarbonat (DEPC) (zur Herstellung von RNase freien Lösungen) Sigma
- TRIzol®-Reagenz GIBCO

TE-Puffer (pH 7,5): – 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (RNA ist empfindlicher als DNA gegenüber alkalischem pH.)
 – 1 mM EDTA

PBL (Isolation siehe 3.2.3) wurden eine Woche mit 1 µg/mL PHA stimuliert. 10⁷ PBL wurden mit 1 mL TRIzol®-Reagenz versetzt. Die Präparation der Total-RNA erfolgte nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in TE-Puffer (RNasefrei, pH 7,5) mit 0,5% SDS gelöst und bei -70°C gelagert.

Isolation der Poly-(A)⁺-mRNA

- Oligo(dT)-Zellulose Sigma
- LiCl, Glaswolle Serva
- 1 mL-Einwegspritze, Dreiwegehahn Braun

2x Ladepuffer: – 1 M LiCl
 – 40 mM TrisHCl, pH 7,5
 – 2 mM EDTA
 – 0,2% SDS
 – DEPC-dH₂O

Waschpuffer: – 0,1 mM LiCl
 – 20 mM TrisHCl, pH 7,5
 – 1 mM EDTA
 – 0,1% SDS
 – DEPC-dH₂O

Elutionspuffer: – TE, pH 7,5 (**kein SDS!!!** sonst Enzymreaktionen für die cDNA-Synthese gehemmt)

100 mg Oligo(dT)-Zellulose wurden in 1 mL 1x Ladepuffer über Nacht inkubiert. Eine 1 mL-Spritze, die mit sialinierter Glaswolle gestopft wurde, wurde mit der Oligo(dT)-Zellulosesuspension befüllt und mit 10 Säulenvolumina 1x Ladepuffer gewaschen. Zum Verschließen der Säule wurde ein Dreiwegehahn verwendet. Die RNA wurde mit einem Volumen 70°C-heißen 2x Ladepuffer versetzt, 10 min bei 70°C denaturiert und auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde aufgefangen, denaturiert und erneut aufgetragen. Die Säule wurde mit 3 mL Waschpuffer gewaschen. Die Poly(A⁺)-mRNA wurde mit 2 mL 50°C temperierten TE-Puffer (pH 7,5) eluiert und anschließend durch Ethanolpräzipitation gefällt.

Herstellung der cDNA aus der Poly(A⁺)-mRNA

- *Universal RiboClone*® cDNA-Synthese System, inkl. S-400-Säulen Promega

TEN-Puffer: – TE-Puffer (pH 7,5) mit 100 mM NaCl

Die mRNA der humanen PBL wurde mit dem *Universal RiboClone*® cDNA-Synthese System nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben (Gubler und Hoffman, 1983; Okayama und Berg, 1982). Der (-)-Strang wurde an der mRNA mit der AMV-Reverse-Transkriptase (*avian myeloblastoma virus*) synthetisiert. Der (+)-Strang wurde durch die DNA-Polymerase I in Gegenwart von RNA-Polymerase H erzeugt und mit der T4-Polymerase vollendet. Die Gesamt-cDNA wurde über Sephacryl S-400-Säulen größenfraktioniert (> 400 bp), um einen hohen Anteil vollständiger cDNAs zu erhalten.

3.4.6 DNA-Sequenzierung

– pOPE51- <i>forward</i> -Primer:	5' –GTGTTGACTTGTGAGCGGAT–3'	Biotez
– pOPE51- <i>reverse</i> -Primer:	5' –TCTCCGGACACGATTACTAG–3'	Biotez
– Pel B-Primer (Sequenzierungsprimer für das Plasmid pOPE51)		J. Schenk
– <i>c-myc</i> -Primer (Sequenzierungsprimer für das Plasmid pOPE51)		J. Schenk
– T3-Primer (Promoter)		InViTek
– T7-Primer (Promoter)		InViTek
– M13- <i>reverse</i> -Primer		InViTek

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma InViTek durchgeführt. Für die Sequenzierung der scFv-Fragmente im Plasmid pOPE51 wurden die Oligonukleotide PelB, c-Myc, pOPE51-*forward* und pOPE51-*reverse* verwendet. Für die Sequenzierung der DNA-Fragmente in den Plasmiden pBSSK, pCMX und pCDNA3 wurden die Standardprimer T3, T7 und M13-*reverse* eingesetzt.

3.4.7 Immunodotblot

– AEC (2-Amino-9-ethylcarbazol)	Sigma
– BCIP (5-Brom-4-chlor-indolylphosphat, p-Toluidinsalz)	Calbiochem
– NBT (Nitrotetrazoliumblauschwarz)	Calbiochem
– Caseinat, NaOH, NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄	Serva
– 30%ige H ₂ O ₂ -Lösung, Dimethylformamid (DMF)	Sigma
– Tween®-20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat)	Sigma
– Nitrozellulosemembranen	Boehringer Mannheim

Blockierungspuffer:

- 2,5% hydrolysiertes Caseinat in PBS
- 50 g Caseinat in 500 mL 0,3 N NaOH über Nacht bei RT hydrolysieren
- 5,96 g/L NaCl
- 0,27 g/L KCl
- 0,24 g/L NaH₂PO₄
- 1,44 g/L Na₂HPO₄
- mit HCl auf pH 7,5 einstellen und auf 1 L auffüllen

Waschpuffer: – PBS mit 0,05% Tween-20

AEC-Stammlösung: – 100 mg/mL AEC in N,N'-Dimethylformamid (DMF)

BCIP-Stammlösung: – 100 mg BCIP in 1,9 mL DMF

NBT-Stammlösung: – 100 mg NBT in 1,9 mL 70% (v/v) DMF lösen

Peroxidase-Nachweisreaktion

AEC-Färbelösung:

- in der angegebenen Reihenfolge und immer frisch ansetzen
- 100 µL AEC-Stammlösung in 5 mL 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.5)
- 2 µL 30%ige H₂O₂-Lösung

Alkalische Phosphatase-(AP)-Nachweisreaktion

AP-Substratpuffer:

- 100 mM TrisHCl (pH 9.5)
- 5 mM MgCl₂

BCIP/NBT-Färbelösung

- 5 mL AP-Substratpuffer
- 33 µL NBT-Stammlösung
- 17 µL BCIP-Stammlösung

Stop-Puffer

- 5 mM EDTA (pH 8.0)
- 20 mM TrisHCl (pH 8.0)

1 – 10 µL der Proteinlösung wurden langsam auf definierte Stellen der Nitrozellulosemembran pipettiert und eingetrocknet. Anschließend wurde die Membran 1 – 4 h im Blockierungspuffer inkubiert. Die Antikörper wurden in Blockierungspuffer verdünnt (mindestens 1:1000) und 1 – 4 h mit der Membran inkubiert (RT). Nach der Inkubation wurde die Membran 3x 10 min in Waschpuffer gewaschen. Färbungen mit einem sekundären Antikörper wurden analog durchgeführt. Danach wurde die Membran in der Färbelösung inkubiert. Die Färbung wurde unter fließendem Wasser abgestoppt, wenn die Färbung intensiv genug war oder sich der Hintergrund zu verfärben begann. Die Dotblots wurden nach Einscannen mit dem Programm TINA (raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) ausgewertet.

3.4.8 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

- | | |
|---|---------|
| – p-Nitrophenolphosphat (pNPP, Sigma-Fast [®] , Substrat für die AP (<i>alkaline phosphatase</i>)) | Sigma |
| – o-Phenyldiamin-2 HCl (OPD, Sigma-Fast [®] , Substrat für die HRPo (<i>horse radish peroxidase</i>)) | Sigma |
| – MgCl ₂ , Diethanolamin | Sigma |
| – NaHCO ₃ (Natriumbicarbonat) | Serva |
| – HCl, H ₂ SO ₄ | Roth |
| – 96-well-Mikrotiterplatten mit Beschichtung für hohe Proteinbindung (Nunclo TM) | Nunc |
| – 96-well-Platten mit 12 Streifen zu je 8 Ansätzen und einer Beschichtung für hohe Proteinbindung (Microlon 600 TM) | Greiner |

Coating-Puffer: – 50 mM Natriumbicarbonatpuffer (pH 9,6)

Blockierungspuffer: – siehe Immunodotblot (3.4.7)

Waschpuffer: – PBS mit 0,05% Tween-20

Peroxidase-Substratpuffer:

- Citrat-Phosphatpuffer pH 5,0
- 10 g/L Zitronensäure x H₂O (Roth)
- 14 g/L wasserfreies Na₂HPO₄ (Serva)
- 40 µL 30%iges H₂O₂/100 mL (kurz vor Gebrauch)

Alkalische Phosphatase-Substratpuffer:

- 1 M Diethanolamin
- 1 mM MgCl₂
- mit HCl auf pH 9,8 einstellen

Peroxidase-Stopplösung:

3 N HCl oder 3 N H₂SO₄

AP-Stopplösung:

3 N NaOH

1 – 4 µg/mL Antigen wurden mit 50 mM Bicarbonatpuffer (pH 9,6) verdünnt und 50 µL/well auf eine ELISA-Platte übertragen. Das „Coating“ wurde über Nacht (RT) durchgeführt. Danach wurde die Platte mehrfach mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 250 µL/well Blockierungspuffer mindestens 1 h (RT) blockiert. Der Blockierungspuffer wurde verworfen und 100 µL/well der scFv-Fragmente, scFv-hFc-Proteine oder Antikörper (Verdünnungen ggf. mit Blockierungspuffer durchführen) übertragen. Alle Ansätze wurden mindestens als Duplikate ausgeführt. Nach 1 h Inkubation (RT) wurde die Platte 4 – 5x mit Waschpuffer gespült. Danach wurde 100 µL/well eines Enzym-gekoppelten Nachweisantikörpers zugegeben (meistens 1:1000 in Blockierungspuffer). Die Inkubation wurde nach 1 h (RT) durch 4 – 5x Waschen beendet und 100 µL/well Färbelösung zugegeben. Die Reaktionen der Peroxidase (HRPo) wurden mit 1 – 4 mg/mL OPD in Citrat-Phosphatpuffer pH 5,0 durchgeführt und mit 50 µL/well 3 N HCl oder 3 N H₂SO₄ abgestoppt. Die Messung wurde nach Abstoppen bei 492 nm in einem ELISA-Reader durchgeführt. Reaktionen der

Alkalischen Phosphatase (AP) wurden mit 1 – 4 mg/mL pNPP in Diethanolaminpuffer durchgeführt, mit 50 µL/well 3 N NaOH-Lösung gestoppt und bei 405 nm gemessen. Als Referenzfilter wurden 600 nm-, 620 nm- oder 690 nm-Filter verwendet.

3.4.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

– vertikale PAGE-Apparatur für Minigele	GIBCO
– Stromversorgungsgerät	Biometra
– Natriumdodecylsulfat (SDS) (10% (w/v) SDS-Stammlösung)	Sigma
– Bromphenolblau (gesättigt in 0,1% Ethanol), β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma
– n-Butanol	Roth
– Dithiothreitol (DTT)	Calbiochem
– Ammoniumpersulfat (APS) (10% (w/v) Stammlösung, kleine Aliquots bei –20°C)	Sigma
– N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Sigma, Serva
– Saccharose (<i>sucrose</i>)	Serva
– Protogel® - 30%ige Polyacrylamidlösung (PAA-Lösung, 30% (w/v) Acrylamid (AA) + 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) = 37,5 : 1)	National Diagnostics (Biozym)
– Molekulargewichtsstandards (farbstoffmarkiert, Benchmark™)	Gibco

4x Sammelgel-puffer:

- 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8
- 0,1% SDS
- entgasen

4x Trenngel-puffer:

- 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8
- 0,1% SDS
- entgasen

10x Elektroden- und Lauf-puffer:

- 144 g/L Glycin
- 30 g/L Tris-Base
- 3 – 10 g/L SDS
- auf 1 L mit dH₂O auffüllen
- ergibt pH 8.9 (nicht nachstellen)

3x Proben-puffer:

- 3,5 mL 4x Sammelgelpuffer
- 1,5 mL Glycerol
- 2,5 mL 20%iges (w/v) SDS
- 0,5 mL gesättigte Bromphenol-blaustammlösung
- 0,5 ml β-ME oder 6,2% (w/v) DTT (für reduzierende Bedingungen!!!)
- auf 10 mL mit dH₂O

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Eine Beschreibung ist in „Gentechnische Methoden“ (Hrsg. Gassen/Schrimpf, 2. Auflage, Gustav-Fischer Verlag) zu finden.

3.4.10 Westernblot

– Nitrozellulosemembran, PVDF-Membran	Sartorius (Faust)
– <i>Blotting</i> -Filter (0,2 – 0,4 mm)	Faust
– <i>Semidry-Blotting</i> -Apparatur mit Graphitelektroden	Roth

Universal-Semidry-Transfer-Puffer:

- 25 mM (3,03 g/L) Tris-Base
- 192 mM (14,4 g/L) Glycin
- 10 – 20% (v/v) Methanol
- pH 8.3 (für Graphitelektroden auf jeden Fall < pH 8.5, **pH-Wert nicht nachstellen!!!**)

CombiPolTM-Mix (InviTek) und den Primern BW431/26-V_L-1A und BW431/26-V_L-2 (10 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 74^{\circ}\text{C}$ + 15 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 78^{\circ}\text{C}$) amplifiziert. Die V_H-Region wurde aus 1 ng pAB-431/26-V_H-humΔγ3 mit den Primern BW431/26-V_H-1A und BW431/26-V_H-2 (10 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 64^{\circ}\text{C}$ + 25 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 69^{\circ}\text{C}$) amplifiziert. Das V_L-Fragment wurde mit SmaI (2 h, 25°C) und NcoI (2 h, 37°C) in NEB4-Puffer geschnitten. Das V_H-Fragment wurde mit SmaI (2 h, 25°C, NEB4) und mit EagI (2 h, 37°C, 2xNEB4) geschnitten. Der Vektor pOPE51 wurde mit den Enzymen NcoI (4 h) und NotI (2 h) in NEB3-Puffer verdaut. Das Vektorfragment wurde mit SAP dephosphoryliert und mit den beiden V-Fragmenten ligiert. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte im E. coli-Stamm XL1-Blue (**20 mM Glykose im Medium und auf den LB-Platten!**). Mehrere Klone wurden präpariert und sequenziert. Durch erneute Klonierung wurden Fragmente mit korrekter Sequenz zusammengefaßt. *Silent*-Mutationen wurden vernachlässigt. Das erhaltene scFv-Fragment mit der Konfiguration **V_L / Linker-218 / V_H** wurde mit **scBW431/26** bezeichnet.

Aus den V-Regionen des Antikörpers BW431/26 wurde ein weiteres scFv-Fragment konstruiert, bei dem die V_H-Region über den Yol-Linker mit der V_L-Region fusioniert wurde. Die Klonierung erfolgte zusammen mit der Konstruktion des scFv-Fragments scPhOx (V_L / Linker-218 / V_H, siehe 3.5.2). Die BW431/26-V_H-Region (V_H^{BW431/26}) wurde mit Eco81I (Y⁺/Tango) und PvuII (NEB2, Staraktivität!) aus dem Plasmid pOPE51-scBW431/26 herausgeschnitten und an die Stelle der V_H^{PhOx}-Region im Vektor pOPE51-PhOx-Yol kloniert. Das erhaltene Plasmid pOPE51-V_H^{BW431/26} / Yol-Linker / V_L^{PhOx} wurde mit MluI und BamHI (1,5xUni-Puffer) geschnitten und die V_L^{PhOx}-Region durch die V_L^{BW431/26}-Region ersetzt, die aus dem Plasmid pUC19-LC431 mit den Primern BW431/26-V_L-1B und -2 (10 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 74^{\circ}\text{C}$ + 15 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 78^{\circ}\text{C}$, CombiPolTM-Mix) amplifiziert wurde. Das erhaltene scFv-Fragment mit der Konfiguration **V_H / Yol-Linker / V_L** wurde mit **BW431/26-Yol** bezeichnet.

3.5.2 Konstruktion des phOx-spezifischen scFv-Fragments scPhOx

Primer

NcoI

PhOx-V_L-Primer1: 5'-AGAACCATGG ACATCCAGAT GACGCAGCCG CCCTCA-3'

BamHI

PhOx-V_L-Primer2: 5'-AGAAGGATCC TAGGACGGTG ACCTTGGTC-3'

Die PhOx-Yol-V_H-Region wurde aus dem Plasmid pOPE51-PhOx-Yol mit den Enzymen Eco81I und PvuII herausgeschnitten und an die Stelle der BW431/26-V_H-Region im Plasmid pOPE51-scBW431/26 (siehe 3.5.1) kloniert. Das resultierende Plasmid pOPE51-V_L^{BW431/26} / Linker-218 / V_H^{PhOx} wurde mit den Enzymen NotI (2xUni-Buffer) und BamHI (1,5xUni-Buffer) geschnitten und das Fragment Linker-218 / V_H^{PhOx} isoliert. Die V_L^{PhOx}-Region wurde aus dem Plasmid pOPE51-PhOx-Yol mit den Primern PhOx-V_L-1 und -2 und der Pfu-Polymerase (10 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 70^{\circ}\text{C}$ + 20 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 75^{\circ}\text{C}$) amplifiziert und mit den Enzymen NcoI und BamHI (1,5x Uni-Buffer) geschnitten. Die Fragmente V_L^{PhOx} und Linker-218 / V_H^{PhOx} wurden über die NcoI- und NotI-Schnittstellen (NEB3) in das Plasmid pOPE51 kloniert. Das erhaltene scFv-Fragment mit der Konfiguration **V_L / Linker-218 / V_H** wurde mit **scPhOx** bezeichnet.

3.5.3 Expression und Westernblot-Analyse der scFv-Fragmente in *E. coli*

- Glukose Sigma
- Isopropylthiogalactosid (IPTG) Calbiochem
- 2x TY-Medium (3.4.1)
- 4x Saccharose (1,6 M Saccharose in PBS, sterilfiltrieren)

Die Expression der scFv-Fragmente erfolgte im *E. coli*-Stamm XL1-Blue. XL1-Blue-Zellen wurden mit den Plasmiden pOPE51-scBW431/26, BW431/26-Yol, -scPhOx oder -PhOxYol transformiert und in 5 mL 2x TY-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und 20 mM Glukose inokuliert. 2,5 mL der Vorkultur wurden in 240 mL 2xTY mit 20 mM Glukose und 100 µg/mL Ampicillin in einem Erlenmeyerkolben (mit Einbuchtungen) bei 37°C und 250 U/min geschüttelt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden 80 mL 4x Saccharose (Endkonzentration 0,4 M) dem Medium hinzugegeben und die Expression mit 0,1 mM IPTG gestartet. Die Kultur wurde 36 h bei RT (ca. 26 – 28°C!!!) und 250 U/min geschüttelt. Die Suspension wurde 10 min bei 3500 U/min (JA10, Beckman) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert und zur Isolation der scFv-Fragmente (3.5.4) eingesetzt.

In einem weiteren Ansatz wurden XL1-Blue-Zellen, die mit den scFv-Konstrukten transformiert waren, wie beschrieben angeschüttelt und die Expression mit 1 mM IPTG induziert (keine Zugabe von Saccharose!). Nach 4 h Expression bei 37°C wurden die Bakterienpellets 2x mit PBS gewaschen und in 5 mL PBS resuspendiert. 200 µL der Bakterienpellets wurden mit reduzierendem oder nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgekocht. Nichtlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Die Proben wurden für die SDS-PAGE (3.4.9) und Westernblotanalyse (3.4.10) eingesetzt. Die Westernblotmembranen wurden mit dem Antikörper 9E10 (1:2000) und einem AP-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG(H+L)-F(ab')₂-Fragment (1:5000) gefärbt (3.4.7).

3.5.4 Reinigung und Bindungsanalyse der scFv-Fragmente

- Peristaltikpumpe Pharmacia
- Dialyseschlauch mit MWCO 10000 Roth
- Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension Qiagen
- Imidazol Sigma

Lysepuffer:

- 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0
- 300 mM NaCl
- 5 mM Imidazol

Waschpuffer:

- 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0
- 300 mM NaCl
- 20 mM Imidazol

Elutionspuffer:

- 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0
- 300 mM NaCl
- 250 mM Imidazol

Die scFv-Fragmente enthielten einen C-terminalen (His)₅-Tag, der die Aufreinigung über eine Ni²⁺-NTA-Agarosesäule ermöglichte. Der Überstand aus dem Expressionsansatz (3.5.3) wurde mit dem dreifachen Volumen Lysepuffer gemischt und auf die Ni²⁺-NTA-Agarosesäule aufgetragen, die an eine Peristaltikpumpe angeschlossen war (ca. 0,5 mL/min). Anschließend wurde die Säule mit 10 Säulen-

volumina Waschpuffer gewaschen. Die Elution der (His)₅-Tag-scFv-Proteine erfolgte mit 10 Säulenvolumina Elutionspuffer. Das Eluat wurde anfänglich in 0,5 mL-Fractionen später in 1 mL-Fractionen gesammelt. 5 µL jeder Fraction wurden mit 45 µL 50 mM Bicarbonatpuffer (pH 9.6) versetzt und zum „Coating“ von ELISA-Platten verwendet. Die scFv-Proteine wurden durch ELISA (3.4.8) mit dem Antikörper 9E10 (1:1000) und einem AP-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG(H+L)-F(ab')₂-Fragment (1:1000) nachgewiesen. Die Fractionen mit dem höchsten Gehalt an scFv-Protein wurden gesammelt und gegen PBS dialysiert (MWCO < 10 kDa).

Die scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol wurden auf ihre Bindung gegenüber CEA-Protein mittels ELISA (3.4.8) untersucht, während die scFv-Fragmente scPhOx und PhOx-Yol auf ihre Bindung gegenüber PhOx-BSA (Herstellung von PhOx-BSA siehe 3.10.7) getestet wurden. Der Nachweis der scFv-Fragmente erfolgte mit dem Antikörper 9E10 (1:1000) und einem AP-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG(H+L)-F(ab')₂-Fragment (1:1000).

3.6 Konstruktion der scFv-hFc-Fusionsproteine

3.6.1 Konstruktion des sekretorischen Signalpeptids

Primer

Leader-1A: HindIII BglIII NcoI
5' -GATGAAGCTT AGCAGATCTC CATGGGGATGG AGCTGTATCA TCCTCTTCCT GGTAGC-3'
BlpI

Leader-2A: ScaI ApaLI
5' -GTAGAGTACT GTGCACGCCT GTAGCTGTTG CTACCAGGAA GAGGATGATA C-3'

Leader-1C: HindIII BglIII
5' -CATGAAGCTT AGCAGATCTA TGGGATGGAG CTGTATCATC CTCTTCCTGG TAGC-3'
BlpI

Leader-2C: NcoI ApaLI
5' -CAGACCATGG AGTGCACGCC TGTAGCTGTT GCTACCAGGA AGAGGATGAT AC-3'

Die Signalpeptidsequenzen (*Leader*) für die sekretorische Expression der scFv-hFc-Proteine wurden mit Primern erzeugt, die gleichzeitig als PCR-*Template* dienten. Die Primer wurden mit 1/10 der Standardkonzentration eingesetzt (20 nM). Nach Denaturierung wurden 2,5 U Taq-Polymerase in den Ansatz gegeben. Der erste Zyklus wurde bei 66°C *Annealing* (15 s Elongation) und die nachfolgenden 10 Zyklen wurden bei 78°C *Annealing* (15 s Elongation) durchgeführt. Nach dem Auffüllen der Enden wurden die Ansätze auf 80°C erhitzt, mit 1/10 Volumen 10x DNA-Ladepuffer versetzt und die PCR-Fragmente in einem 2,5%iges Agarosegel isoliert (*Leader-A* = 85 bp, *Leader-C* = 84 bp).

3.6.2 Isolation des humanen IgG1-Fc-Teils

Plasmide

pCMX-sFGFR4-hFc
pCDNA3

M. Seidensticker, MDC (Gao und Goldfarb, 1995)
Invitrogen

Primer

hFc-1: 5' -CAAGAAGCTT ^{HindIII} AGCAAGATCT ^{BglIII (BamHI-kompatibel)} GCGGCCGCCG AGCCCAAATC TTGTGACA-3' ^{NotI}

hFc-2: 5' -CAACTCTAGA ^{XbaI} ^{XhoI} CTCGAGACGC TCATTACCC GGAGACA-3'

hFc-2B: 5' -TAACCTCGAG ^{XhoI} ^{XbaI} ^{BamHI} TCTAGATCAT GGATCCTTAC CCGGAGACAG GGAGA-3'

2 ng des Plasmids pCMX-sFGFR4-hlgG-hFc wurden mit den Primern hFc-1 und hFc-2 und der Pfu-Polymerase amplifiziert (10 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 60^{\circ}\text{C}$ + 20 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 76^{\circ}\text{C}$). Das PCR-Fragment wurde nach Aufreinigung mit den Enzymen HindIII und XbaI (NEB2, BSA) verdaut und in das Plasmid pCMX-sFGFR4-hFc anstelle des sFGFR4-hFc-Fusionsrezeptorgens kloniert. Der erhaltene Vektor wurde mit **pCMX-hFc** bezeichnet.

Analog wurde der humane Fc-Teil mit der 3'-BamHI-Fusionsschnittstelle über die Primer hFc-1 und hFc-2B amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit den Enzymen HindIII und XhoI (NEB2, BSA) in den Vektor pCDNA3 kloniert. Das Produkt wurde mit **pCDNA3-hFcB** bezeichnet.

3.6.3 Konstruktion der scFv-hFc-Proteine scBW431/26-hFc und scPhOx-hFc

Das PCR-Fragment des **Leader-A** (aus 3.6.1) wurde mit HindIII und Scal (SuRECut B) geschnitten. Die Plasmide pOPE51-scBW431/26 und pOPE51-scPhOx wurden mit dem Enzym NcoI (NEB3) geschnitten und die überhängenden 5'-Enden mit der S1-Nuclease entfernt (3.4.3). Die scFv-Genfragmente wurden anschließend durch Restriktion mit NotI (NEB3) isoliert. Der **Leader-A** wurde zusammen mit dem jeweiligen scFv-Fragment in die HindIII- und NotI-Schnittstellen des Plasmids pCMX-hFc kloniert. Der **Leader-C** (aus 3.6.1) wurde mit den Enzymen HindIII und NcoI (NEB2) geschnitten. Die scFv-Konstrukte scBW431/26 und scPhOx wurden mit NcoI und NotI (NEB3) aus den Plasmiden pOPE51-scBW431/26 und pOPE51-scPhOx isoliert. Die Klonierung des **Leader-C** erfolgte zusammen mit den scFv-Fragmenten in die HindIII- und NotI-Schnittstellen des Vektors pCMX-hFc. Die scFv-hFc-Konstrukte wurden mit **scBW431/26-hFc** und **scPhOx-hFc** bezeichnet. Die Klone erhielten in Abhängigkeit vom verwendeten **Leader** die Bezeichnungen **Ax** oder **Cx** (x = Nummer).

3.6.4 Konstruktion des scHuM195-hFc-Proteins

Plasmide

pUC18-HuM195.VL
pUC18-HuM195.VH

Man Sung Co (*Protein Design Labs Inc.*), David Scheinberg
(*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*), New York, USA

Primer

ApaLI NcoI
HuM195-V_L1: 5'-TCTGGTGCAC TCCATGGACA TTCAGATGAC CCAGTCT-3'

 SmaI
HuM195-V_L2: 5'-CACCCTCCC GGGCTTTCCT AGACCGGAAG TGGTTCCTTT GATTTCACC
 TTGGTCCCTT GA-3'

 SmaI
HuM195-V_H3: 5'-AAGCCCGGGA GTGGTGAAGG TAGCACTAAA GGTCAGGTTC AGCTGGTGCA
 GTCT-3'
 BamHI NotI wäre günstiger gewesen!
HuM195-V_H4: 5'-TGGTGGATCC TGAAGAGACA GTGACCAGAG T-3'

Die V_L-Region wurde mit den Primern HuM195-V_L-1 und -2 aus dem Plasmid pUC18-HuM195.VL mit der Pfu-Polymerase amplifiziert (10 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 66^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{Annealing}} = 30\text{ s}$ + 15 Zyklen mit $T_{\text{Annealing}} = 76^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{Annealing}} = 60\text{ s}$). Unter denselben Bedingungen wurde die Amplifikation der HuM195-V_H-Region aus dem Plasmid pUC18-HuM195.VH mit den Primern HuM195-V_H-3 und -4 durchgeführt. Die V_L-Region wurde mit den Enzymen SmaI (25°C, NEB4, BSA, 1 h, unvollständiger Verdau wegen zweiter SmaI-Schnittstelle in der V_L-Region) und ApaLI (37°C, NEB4, BSA) geschnitten und das 400 bp-Fragment isoliert. Die V_H-Region wurde mit den Enzymen SmaI (25°C) und BamHI (NEB4) verdaut. Die Signalpeptidsequenz *Leader-C* wurde aus dem Plasmid pCMX-scBW431/26-hFc durch Restriktion mit HindIII und ApaLI (NEB2) isoliert. Das *Leader-C*-Fragment und die PCR-Fragmente der beiden HuM195-V-Regionen (inkl. *Linker*-218) wurden in die HindIII- und Bgl II-Schnittstellen (Y⁺/Tango) des Plasmids pCMX-hFc ligiert. Das scFv-Fragment des resultierenden scFv-hFc-Konstruktes **scHuM195-hFc** lag in der Konfiguration **V_L / Linker-218 / V_H** vor.

3.6.5 Expression und Analyse der scFv-hFc-Proteine

- CEA (aus der Kolonkarzinomzelllinie SW1116; Kat-Nr. 219369) Calbiochem
- humaner IgG-Proteinstandard Dianova

Die Plasmide pCMX-scBW431/26-hFc, pCMX-scPhOx-hFc (*Leader-A/C*) und pCMX-scHuM195-hFc (nur *Leader-C*) wurden mittels Kalziumphosphattransfektion (3.2.4) in die 293T-Zellen transfiziert. Die Überstände wurden nach drei Tagen abgenommen. 10 µL der Überstände wurden für den Immuno-dotblot (3.4.7) zum Nachweis der sekretorischen Expression der scFv-hFc-Fusionsproteine eingesetzt. Um die Konzentration des scFv-hFc-Proteins quantitativ zu bestimmen, wurde ein humaner IgG-Proteinstandard eingesetzt. Die Dotblots wurden mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-human-Fc(γ)-Antikörper (1:1000) gefärbt. Die scBW431/26-hFc-Fusionsproteine wurde im ELISA (3.4.8) auf ihre Bindung gegenüber CEA-Protein analysiert. Die scPhOx-hFc-Fusionsproteine wurden auf ihre Bindung gegenüber PhOx-BSA (Herstellung siehe 3.10.7) untersucht. Als Kontrollantigen diente BSA. Der Nachweis erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-human-IgG-Fc(γ)-Antikörper (1:1000). Das scFv-hFc-Protein scHuM195-hFc wurden durch die FACS-Analyse von myeloischen Leukämiezelllinien auf seine Bindungseigenschaften getestet (3.8.3).

3.7 Herstellung chimärer Immunglobulin-T-Zellrezeptoren

3.7.1 Isolation der cDNA der humanen CD3 ζ -Kette

Plasmid: *pBS/SK(-)-CD8 α hinge* (pBlueScript-SK(-) von Stratagene mit humaner CD8 α -hinge-Region.
Die Plasmidkarte ist im Anhang angegeben.)

Primer zur Isolation der cDNA der gesamten CD3- ζ -Kette:

Primer- ζ -1A: 5'-GGACAAGATG AAGTGGGAAGG-3'

Primer- ζ -2A: 5'-CGTGAGAAGA GTGAACCGGG-3'

Primer zur Isolation der Transmembran- und zytoplasmatische Domäne der CD3 ζ -Kette (inkl. Restriktionsschnittstellen):

BamHI

Primer- ζ -1B: 5'-CCTAG|GATCC CAAACTCTGC TACCTGCTGG ATGGAATCC-3'

HindIII

Primer- ζ -2B: 5'-CCAGA|AGCTT TGAGTGGAGA AATCCCCTGG CAGTTAGCGA CC-3'

Die cDNA der gesamten humanen ζ -Kette des TCR-CD3-Komplexes wurde aus 1 ng Gesamt-cDNA aktivierter PBLs (siehe 3.4.5) mit den Primern ζ -1A und -2A und der Pfu-Polymerase (20, 25 und 30 Zyklen bei $T_{\text{Annealing}} = 60^\circ\text{C}$, $t_{\text{Elongation}} = 150\text{ s}$) amplifiziert. 1/10 dieser PCR-Ansätze wurde mit den Primern ζ -1B und -2B (16 oder 21 Zyklen bei $T_{\text{Annealing}} = 60^\circ\text{C}$, $t_{\text{Elongation}} = 120\text{ s}$) amplifiziert, um das Fragment zu erhalten, das die Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen der CD3 ζ -Kette umfaßt. Das PCR-Fragment wurde mit BamHI und HindIII (SuRE-Cut B) geschnitten und in den Vektor pBS/SK(-)-CD8 α hinge kloniert.

3.7.2 Konstruktion der chimären Immunglobulin-T-Zellrezeptor-konstrukte

Die clgTCR-Konstrukte wurden durch Fusion der scFv-hFc-Genkonstrukte mit der CD3 ζ -Kette erzeugt. Das Fragment für die Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen der CD3 ζ -Kette wurde mit den Enzymen BamHI und XhoI (NEB2, BSA) aus dem Plasmid pBS/SK-CD8 α hinge- ζ (aus 3.7.1) herausgeschnitten und in das Plasmid pCDNA3-hFcB (aus 3.6.2) kloniert. Das resultierende Plasmid pCDNA3-hFc ζ enthielt jedoch 2 HindIII-Schnittstellen, so daß das hFc ζ -Fragment aus dem Plasmid pCDNA3-hFc ζ mit den Enzymen NotI und XhoI (NEB3) noch einmal isoliert werden mußte. Die scFv-Fragmente scBW431/26 und scPhOx (inkl. der Signalpeptidsequenzen *Leader-A/-C*) wurden mit den Enzymen HindIII (NEB2, 2 h) und NotI (NEB3, 2 h) aus den Plasmiden pCMX-scBW431/26-hFc und pCMX-scPhOx-hFc isoliert und zusammen mit dem hFc ζ -Fragment in die HindIII- und XhoI-Schnittstellen (NEB2, BSA) des Vektors pCDNA3 kloniert. Die clgTCR-Konstrukte wurden entsprechend ihrer scFv-Fragmente mit **scBW431/26-hFc ζ** und **scPhOx-hFc ζ** bezeichnet.

Das scFv-Fragment scHuM195 (inkl. *Leader-C*) wurde mit den Enzymen BlnI (NEB2, 2 h) und NotI (NEB3, 2 h) aus dem Vektor pCMX-scHuM195-hFc herausgeschnitten und in das Plasmid pCDNA3-hFc ζ kloniert. Das resultierende clgTCR-Konstrukt wurde mit **scHuM195-hFc ζ** bezeichnet.

3.7.3 Expression und Analyse der clgTCR-Konstrukte in den 293T-Zellen

Die Plasmide pCDNA3-scPhOx-hFc ζ , pCDNA3-scBW431/26-hFc ζ und pCDNA3-scHuM195-hFc ζ wurden mittels Kalziumphosphattransfektion in die 293T-Zellen transfiziert (3.2.4). Ein bis zwei Tage nach Transfektion erfolgte die Messung der clgTCR-Expression mittels FACS-Analyse (3.2.4). Die Zellen wurden abgelöst und mit einem FITC-konjugierten Ziege-anti-human-IgG-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment (1:100) gefärbt. Als Negativkontrolle wurden 293T-Zellen mit dem Leervektor pCDNA3 *mock*-transfiziert und analysiert. Außerdem wurde die CD3 ζ -Kette der clgTCR-Konstrukte mit dem Antikörper 1D4 (1:100) und einem FITC-konjugierten Ratte-anti-Maus-IgG(H+L)-F(ab')₂-Fragment (1:100) durch intrazelluläre FACS-Färbung (3.3.2) untersucht. Als Isotypenkontrolle wurde der Antikörper MOPC21 eingesetzt (Antikörper siehe 3.2.4).

3.8 Antigenexpression auf Tumorzellen

3.8.1 FACS-Analyse phOx-markierter Zellen mit dem scPhOx-hFc-Protein

10⁶ Zellen der ALL-Zelllinie Reh wurden mit 10 μ g PhOx (4-Ethoxymethylen-2-phenyl-2-oxazolin-5-on, siehe 3.10.7) in 1 mL PBS 30 min bei RT im Dunkeln markiert. Die Zellen wurden 3x mit serumhaltigen Medium gewaschen, mit 50 μ L scPhOx-hFc-Protein (Kulturüberstand aus 3.6.5) und einem FITC-konjugierten Ziege-anti-human-IgG-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment (1:100) gefärbt und im FACS analysiert (3.3.1). Als Negativkontrolle wurden ungelabelte Reh-Zellen eingesetzt.

3.8.2 FACS-Analyse von Tumorzelllinien mit dem scBW431/26-hFc-Protein

Das scBW431/26-hFc-Protein wurde zur durchflußzytometrischen Analyse (3.2.4) der Maus-Kolonkarzinomzelllinie MC38 und der aus ihr abgeleiteten CEA-transfizierten Zelllinie MC32A (Klon 6 und 10) eingesetzt. Bei dieser Untersuchung wurden 50 μ L scBW431/26-hFc-Protein mit den Signalpeptiden *Leader-A* und *Leader-C* (Kulturüberstand aus 3.6.5) eingesetzt. Das scPhOx-hFc-Protein (*Leader-A* und -C) und das scHuM195-hFc-Protein (nur *Leader-C*) wurden als Kontrollen eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit einem FITC-konjugierten Ziege-anti-human-IgG-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment (1:100). Zu Vergleichszwecken wurden Färbungen mit dem CEA-spezifischen Antikörper CEJ065 (1:50) und eine geeignete Isotypenkontrolle durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG(H+L)-F(ab')₂-Fragment (1:100) verwendet (Antikörper siehe 3.3).

Die humanen Kolonkarzinomzelllinien HT29, LoVo, LS174T, SW403, SW480, SW948, SW1222 und SW1417 und die Pankreaskarzinomzelllinien Capan2 und Panc89 wurden in gleicher Weise mit dem scBW431/26-hFc-Protein (nur *Leader-A*) und dem Antikörper CEJ065 gefärbt. Färbungen mit dem scPhOx-hFc-Protein und einem Isotypenkontrollantikörper dienten als Negativkontrollen.

3.8.3 FACS-Analyse von Leukämiezelllinien mit dem scHuM195-hFc-Protein

Die FACS-Analyse (3.2.4) der humanen myeloischen Leukämiezelllinien KG1 und HL60 wurde mit 50 µL scHuM195-hFc-Protein (Kulturüberstand aus 3.6.5) und einem FITC-konjugiertem Ziege-anti-human-IgG-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde das scPhOx-hFc-Protein (*Leader-C*) verwendet. Zum Vergleich wurden Färbungen mit dem FITC-konjugierten CD33-spezifischen Antikörper WM54 und einer geeigneten Isotypenkontrolle durchgeführt. Außerdem wurden HL60-Zellen untersucht, die eine Woche mit 1% (v/v) DMSO im Kulturmedium stimuliert wurden. Die HL60-Zellen wurden vor und nach DMSO-Stimulation mit Antikörpern gegen die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, MHC-Klasse-I (HLA-ABC) und das Integrin CD11c gefärbt (Antikörper siehe 3.3).

3.9 Genmodifikation der humanen NK-Zelllinie YT

3.9.1 Gentransfer der clgTCR-Konstrukte in die YT-Zellen

- | | |
|---|------------|
| – Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand!!!) | Eurogentec |
| – BioPulser mit externer Kapazität | BioRad |
| – G418-Sulfat (Stammlösung in 100 mM HEPES) | Calbiochem |

Die Plasmide pCDNA3, pCDNA3-scBW431/26-hFc ζ , pCDNA3-scPhOx-hFc ζ und pCDNA3-scHuM195-hFc ζ wurden mittels Elektroporation in die YT-Zellen transfiziert. 10⁷ YT-Zellen wurden 1x mit RPMI (4°C) gewaschen und in 800 µL kaltem RPMI resuspendiert. Nach Überführen in die Elektroporationsküvette wurden 10 – 20 µg Plasmid-DNA (1 µg/µL) zugegeben und gemischt. Die Küvetten wurden auf Eis gestellt und nach 5 min bei 250 V und 975 µF im Elektroporationsgerät gepulst. Die Küvette wurde anschließend wieder auf Eis gestellt und die Zellsuspension nach 1 – 2 min noch einmal durch mehrfaches Anschnipsen gemischt, um den entstandenen pH-Gradienten zu beseitigen. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Zellen in 50 mL Kulturmedium aufgenommen. Die Selektion mit 500 µg/mL G418 wurde 48 h nach Elektroporation aufgenommen. Die toten YT-Zellen wurden nach etwa einer Woche über einen Lymphoprep™-Dichtegradienten (1.077g/mL, 20 min, 1400 U/min, 20°C) entfernt.

3.9.2 Analyse der clgTCR-Expression der transfizierten YT-Zellen

Die Analyse der clgTCR-Expression auf den transfizierten YT-Zellen erfolgte wie unter 3.7.3 beschrieben. Als Negativkontrolle wurden *mock*-transfizierte YT-Zellen, die mit dem Leervektor pCDNA3 transfiziert worden waren, eingesetzt.

3.9.3 Immunologische Anreicherung der clgTCR⁺ YT-Zellen

- | | |
|--|------------------|
| – FACS-Vantage [®] | Becton Dickinson |
| – Microbead [®] -gekoppelter Anti-FITC-Antikörper | Miltenyi Biotec |
| – Mini- oder Midi-MACS [®] -Magnet + Ständer | Miltenyi Biotec |
| – MS-Säulen (für Mini-MACS [®]), LS-Säulen (für Midi-MACS [®]) | Miltenyi Biotec |

- MACS-Puffer:**
- PBS
 - 0,5% (w/v) BSA
 - 2 mM EDTA
 - sterilfiltrieren (0,2 µm) und vor Verwendung entgasen!!!

Die clgTCR⁺ YT-Zellen wurden über FACS (*fluorescent activated cell sorting*) oder MACS[®] (*magnetic activated cell sorting*) angereichert. Dabei wurden Antikörper spezifisch für die Fc-„Spacer“-Domäne der clgTCR-Konstrukte eingesetzt. Beim FACS-*Sorting* wurden 10⁷ clgTCR-transfizierte YT-Zellen mit 200 µL eines FITC-konjugierten Ziege-anti-human-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragments (1:100 in MACS-Puffer) 15 min bei 4°C gefärbt. Die Zellen wurden gewaschen, in 3 – 4 mL MACS-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit einem FACS-Vantage[®]-Hochleistungs-FACS-Sorter bei einer maximalen Durchflußrate von 4000 Zellen/s getrennt. Das „Gate“ für die positive Fraktion (clgTCR⁺ YT-Zellen) wurde im Histogramm-Plot in der FL-1 festgelegt. Aufgrund des offenen Systems konnten nur semisterile Bedingungen erreicht werden. Kontaminationen wurden jedoch nicht beobachtet.

Beim MACS[®] wurden 10⁷ clgTCR-transfizierte YT-Zellen mit 200 µL eines FITC-konjugierten Ziege-anti-human-IgG-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragments (1:100 in MACS-Puffer) 15 min bei 4°C gefärbt. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit 200 µL eines Microbead[®]-gekoppelten anti-FITC-Antikörpers (1:10 in MACS-Puffer) 30 min bei 4°C gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden 1x gewaschen, in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert und auf die magnetisierte MS-Säule (im Mini-MACS[®]-Magnet) aufgetragen, die zuvor mit 2 mL MACS-Puffer equilibriert wurde. Die magnetisierte Säule wurde anschließend 3x mit 3 mL MACS-Puffer gewaschen. Danach wurde die Säule aus dem Magneten genommen und die gebundenen clgTCR⁺ YT-Zellen mit 5 mL MACS-Puffer eluiert. Die clgTCR⁺ YT-Zellen wurden abzentrifugiert und in Kultur genommen. Die angereicherten clgTCR⁺ YT-Zellen wurden weiterhin unter selektiven Bedingungen (500 µg/mL G418) kultiviert. Die Anreicherung der clgTCR⁺ YT-Zellen wurde nach etwa zwei Wochen wiederholt (Antikörper siehe 3.3).

Die Verwendung von biotinyliertem Ziege-anti-human-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment (1:100, Dianova) und Microbead[®]-gekoppeltem Streptavidin (1:10, Miltenyi Biotec) war zum Anreichern der clgTCR⁺ YT-Zellen mit dem MACS[®]-System nicht geeignet (siehe Ergebnisse 4.3.2).

3.10 Zytotoxizitätsstudien

3.10.1 ⁵¹Cr-Freisetzungssassay

- | | |
|--|------------|
| – [⁵¹ Cr]-Natriumchromat (37 Mbq/mL in PBS, steril, t _{1/2} = 28 d) | NEN Dupont |
| – Triton [®] X-100 (t-Octylphenylpolyethylenglycol) | Sigma |

– Spitzbodenplatten mit 96 Vertiefungen	Greiner
– <i>Lumaplate</i> TM -96, <i>Topseal</i> TM -Film	Packard Instruments
– β -Szintillationszähler <i>Topcount</i> TM	Packard Instruments

IMDM / 10%FCS (IMDM ist besser als RPMI gepuffert.)

RPMI / 10%FCS

2% (w/v) Triton[®] X-100 in dH₂O

Die Zielzellen wurden in 50 μ L RPMI resuspendiert und mit 20 – 50 μ L [⁵¹Cr]-Natriumchromat 90 min bei 37°C markiert. Die Röhrchen wurden alle 10 – 15 min geschüttelt, um eine gleichmäßige Markierung der Zielzellen zu gewährleisten. Danach wurden die Ansätze mit 10 mL RPMI / 10% FCS aufgefüllt, abzentrifugiert und erneut mit 10 mL RPMI / 10% FCS gewaschen. Die markierten Targetzellen wurden in 2 – 5 mL RPMI / 10% FCS resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Targetzellen gezählt. Die benötigte Menge an Targetzellen wurde entnommen, gewaschen und 4 x 10⁴ Zellen/mL in IMDM / 10%FCS resuspendiert. Während der Targetzellmarkierung wurden die Effektorzellen vorbereitet. Sie wurden gewaschen und auf 2 x 10⁶ Zellen/mL in IMDM / 10% FCS eingestellt. Ausgehend von dieser Zellkonzentration wurde eine Verdünnungsreihe in Halbverdünnungsschritten erzeugt und jeweils 75 μ L als Triplikate oder Quadruplikate in Spitzbodenplatten mit 96 Vertiefungen vorgelegt. Anschließend wurden 75 μ L (= 3000 Zellen) der gelabelten Targetzellen zu den Effektorzellen pipettiert, was einem Effektor : Targetzellverhältnis (E : T) von 50:1, 25:1, 12,5:1 ... entsprach. Zur Ermittlung der spontanen [⁵¹Cr]-Freisetzung wurde 75 μ L Medium anstelle der Effektorzellen eingesetzt („0%-Lyse“). Die „100%-Lyse“ der Targetzellen wurde durch Ansätze ermittelt, denen 75 μ L 2% (v/v) Triton[®]X-100 anstelle der Effektorzellen zugegeben wurde. Der Zytotoxizitätsassay wurde 4 – 6 h bei 37°C im CO₂-Inkubator durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Platten 2 min (vorsichtig!) geschüttelt. Anschließend wurden die Platten 5 min bei 1200 U/min abzentrifugiert und 50 μ L Überstand je Ansatz in eine *LumaPlate*TM-96-Szintillatorplatte übertragen. Die anfallenden radioaktiven Abfälle wurden nach den Strahlenschutzrichtlinien gesondert gesammelt und entsorgt. Die Szintillatorplatten wurden über Nacht unter einem Abzug getrocknet und mit *Topseal*TM-Film eingeschweißt. Die Messung wurde in einem β -Szintillationszähler durchgeführt. Die Targetzellyse wurde nach Formel 1 ermittelt. Die Standardabweichungen wurden aus den Triplikaten bzw. Quadruplikaten berechnet. Die Fehler der „0%-Lyse“ und „100%-Lyse“ wurden dabei vernachlässigt.

$$\Delta L [\%] = \frac{\overline{\Delta L}^{[cpm]} - \overline{\Delta L}_{0\%}^{[cpm]}}{\overline{\Delta L}_{100\%}^{[cpm]} - \overline{\Delta L}_{0\%}^{[cpm]}} \times 100\%$$

ΔL [%] ... Lyse der Targetzellen in %

ΔL [cpm] ... Targetzellyse gemessen in cpm (*counts per minute*)

$\Delta L_{0\%}$ [cpm] ... Mittelwert der spontanen ⁵¹Cr-Freisetzung in cpm (Medium)

$\Delta L_{100\%}$ [cpm] ... Mittelwert der 100%ige Lyse in cpm (1% Triton[®] X-100)

Formel 1 – Berechnung der Targetzellyse beim ⁵¹Cr-Freisetzungsassay

3.10.2 Durchflußzytometrischer Zytotoxizitätsassay

- CFSE (5- und 6-Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester-Diacetat, Stammlösung 10 mg/mL in DMSO)
- IMDM (ohne Phenolrot) / 10% (v/v) FCS

Molecular Probes

Stopplösung: PBS / 0,6% (w/v) NaN_3

PI-Lösung: 15 µg/mL PI in PBS

Ein durchflußzytometrischer Zytotoxizitätsassay (modifiziert nach Mattis et al., 1997) wurde bei einigen Versuchen verwendet. Am Vortag wurden 10^7 Zielzellen mit 10 µg des Fluoreszenzfarbstoffs CFSE (1:1000) in 1 mL PBS markiert (5 min, 37°C). CFSE dringt in die Zellen ein, wird dort durch intrazelluläre Esterasen gespalten (Vitalfärbung!) und reagiert mit freien Aminogruppen von Proteinen (kein Tris-Puffer verwenden!). Die Zellsuspension und das Zellpellet entwickelt dabei eine intensive gelbliche Färbung. Anschließend wurden die Zellen 2x mit serumhaltigem Medium gewaschen und über Nacht in Kultur genommen. Am nächsten Tag wurden die CFSE-markierten Zielzellen abzentrifugiert und $2,5 \times 10^5$ Zellen/mL in IMDM ohne Phenolrot resuspendiert. 100 µL dieser Suspension wurden in 0,6 mL-Röhrchen (Greiner) vorgelegt, die in eine 96-well-Platte platziert waren. 100 µL Effektorzellen wurden in einem geeigneten E : T-Verhältnis zugegeben. Die spontane Lyse wurde durch Ansätze ohne Effektorzellen ermittelt. Alle Ansätze wurden als Triplikate ausgeführt. Nach 5 h Inkubation im CO_2 -Inkubator bei 37°C wurde 50 µL/Ansatz PBS / 0,6% NaN_3 zugegeben und die Ansätze auf Eis gestellt, um eine weitere Lyse der Zielzellen zu unterbinden. Die Messung wurde direkt im Anschluß an einem FACS-Gerät durchgeführt, um eine geringe spontane Lyse zu erhalten. Vor der Messung wurde 50 µL PI-Lösung zugegeben und die Proben kräftig gevortext. Es wurden mindestens 1000 CFSE⁺ Zielzellen (FL-1) gemessen. Die Targetzellyse wurde aus dem Verhältnis der toten Zielzellen (CFSE⁺ und PI⁺) und der Gesamtzahl an CFSE⁺ Zielzellen ermittelt (Abbildung 9 und Formel 2).

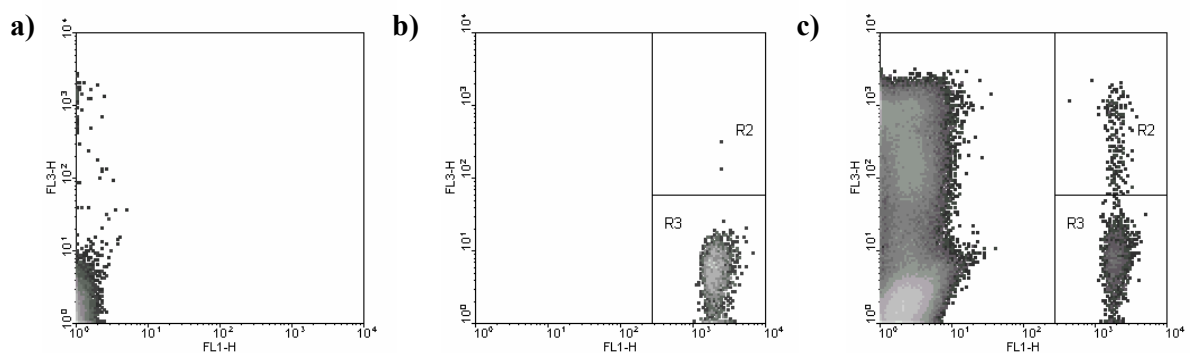


Abbildung 9 - Durchflußzytometrischer Zytotoxizitätsassay

In der Abbildung ist die Auswertung des durchflußzytometrischen Zytotoxizitätsassays dargestellt. Die PhOx-markierten Zielzellen (ALL-Zelllinie Reh) wurden vor (a) und nach (b) der Markierung mit dem Farbstoff CFSE und nach 5 h Inkubation mit den scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen (E : T-Verhältnis = 20 : 1) (c) im FACS-Gerät gemessen. Durch die CFSE-Markierung (FL-1) konnten Effektor- und Zielzellen eindeutig in der FL-1 unterschieden werden (c). Die toten Zellen wurden durch den Farbstoff PI (FL-3) angefärbt.

$$\text{Targetzellyse} = \frac{R2 + R3}{R2}$$

R2 + R3 ... Gesamtzahl der CFSE-markierten Zielzellen

R2 ... Zahl der toten (PI⁺) CFSE-markierten Zielzellen

Formel 2 – Bestimmung der Targetzellyse aus Abbildung 9

3.10.3 Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen

Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen, die mit dem CEA-spezifischen clgTCR-Genkonstrukt transfiziert waren, wurden in 6 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassays (3.10.1) gegenüber der Maus-Kolonkarzinomzelllinie MC38 und der aus ihr abgeleiteten CEA-transgenen Zelllinie MC32A (Klone 6 und 10) untersucht. Die *mock*-transfizierten YT-Zellen, scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen und scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen wurden in parallel durchgeführten Ansätzen als Effektorzellkontrollen eingesetzt. Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen wurde außerdem gegenüber den humanen Kolonkarzinomzelllinien HT29, LoVo, LS174T, SW403, SW480, SW948, SW1222 und SW1417 und den Pankreaskarzinomzelllinien Capan2 (nur 4 h-Assay) und Panc89 untersucht. Die *mock*-transfizierten YT-Zellen und die scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen dienten als Effektorzellkontrollen.

3.10.4 Zytotoxizität der scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen

Die scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen, die mit dem CD33-spezifischen clgTCR-Genkonstrukt transfiziert waren, wurden in 6 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassays (3.10.1) auf ihre Zytotoxizität gegenüber den myeloischen Leukämiezelllinien KG1 und HL60 untersucht. Außerdem wurden HL60-Zellen als Zielzellen eingesetzt, deren Differenzierung eine Woche durch 1% (v/v) DMSO stimuliert wurde. Als Effektorzellkontrollen wurden *mock*-transfizierte YT-Zellen und scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen eingesetzt.

3.10.5 Zytotoxizität der scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen

Die Zytotoxizität der scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen wurde mit dem durchflußzytometrischen Zytotoxizitätsassay (3.10.2) gegenüber PhOx-markierten Zellen getestet. Die Leukämiezelllinie Reh wurde mit CFSE markiert. Am nächsten Tag wurden die CFSE-markierten Reh-Zellen aufgeteilt und eine Hälfte mit dem Hapten PhOx markiert (3.8.1). Die PhOx-gelabelten und nichtgelabelten Reh-Zellen wurden als Zielzellen für die scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen eingesetzt. Die scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen wurden als Effektorzellkontrolle gegenüber den PhOx-markierten Zielzellen eingesetzt.

3.10.6 Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen in Gegenwart von freiem CEA-Protein

Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen wurde in einem 6 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassay (3.10.1) gegenüber der CEA⁺ Tumorzelllinie MC32A in Gegenwart von 0,1 µg/mL, 1 µg/mL und 10 µg/mL an gelöstem CEA-Protein getestet. Das eingesetzte CEA-Protein stammte aus derselben

Charge, die zuvor für die Bindungsstudien des scBW431/26-hFc-Proteins eingesetzt wurden (siehe 3.6.5). Zum Vergleich wurden parallel Ansätze ohne CEA-Protein durchgeführt.

3.10.7 Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen in Gegenwart von gelöstem PhOx-BSA mit einzelnen und multiplen PhOx-Gruppen

- 4-Ethoxymethylen-2-phenyl-2-oxazolin-5-on (PhOx), $M_W = 217$ Da (10 mg/mL Stammlösung in DMSO, frisch herstellen) Sigma
- BSA (Fraktion V), M_W ca. 65 kDa Sigma

Herstellung von (PhOx) $_{20}$ -BSA (= PhOx-BSA mit multiplen PhOx-Gruppen)

- 10 mg/mL BSA
- 0,67 mg/mL PhOx
- in 100 mM NaHCO₃-Puffer (pH 8.5)
- 2 – 4 h schütteln (RT, im Dunkeln)
- Dialyse gegen PBS
- bei -20°C dunkel lagern

Herstellung von (PhOx) $_2$ -BSA (= PhOx-BSA mit einzelnen PhOx-Gruppen)

- wie (PhOx) $_{20}$ -BSA jedoch mit 0,067 mg/mL PhOx

Die Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde gegenüber PhOx-markierten Reh-Zellen (siehe 3.10.5) mit dem durchflußzytometrischen Zytotoxizitätsassay (3.10.2) in Gegenwart von 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL und 100 µg/mL (PhOx) $_{20}$ -BSA sowie von 1 µg/mL, 10 µg/mL und 100 µg/mL (PhOx) $_2$ -BSA bei einem E : T = 10 : 1 untersucht. Außerdem wurde ein Ansatz mit 100 µg/mL BSA durchgeführt. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne gelöstes Antigen (nur Medium) durchgeführt, die zur Festlegung der maximalen Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen gegenüber den phOx-markierten Zielzellen dienten. Alle Ergebnisse wurden ins Verhältnis zu dieser Kontrolle gesetzt.

3.10.8 Wirkung von gelöstem PhOx-BSA mit einzelnen und multiplen PhOx-Gruppen auf die Antigenbindung des scPhOx-hFc-Proteins

Die Antigenbindung des scPhOx-hFc-Proteins wurde in Gegenwart von gelöstem PhOx-BSA mit einzelnen und multiplen Epitopen (Herstellung siehe 3.10.7) untersucht. Der Kulturüberstand mit dem scPhOx-hFc-Protein (10 – 20 µg/mL, aus 3.6.5) wurde aufgeteilt. Zu diesen Ansätzen wurde jeweils ein Volumen aus einer Verdünnungsreihe von gelöstem (PhOx) $_{20}$ -BSA oder (PhOx) $_2$ -BSA zugegeben, um bei konstanter scPhOx-hFc-Proteinkonzentration unterschiedliche Konzentrationen an gelöstem Antigen im Bereich von 1 ng/mL bis 10 µg/mL zu erhalten. Jeweils 100 µL/well wurden in ELISA-Platten übertragen, die mit (PhOx) $_{20}$ -BSA oder mit (PhOx) $_2$ -BSA beschichtet worden waren. Nach 1 h Inkubation (RT) wurden die Platten gewaschen und das gebundene scPhOx-hFc-Protein mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-human-IgG-Fc(γ)-Antikörper (1:1000) nachgewiesen (ELISA siehe 3.4.8). BSA-beschichtete Ansätze dienten als Hintergrundkontrolle und wurden von den Meßwerten abgezogen. Die 100%-Bindungsrate des scPhOx-hFc-Proteins wurde durch Ansätze ohne gelöstes Antigen bestimmt und alle Ergebnisse auf diesen Wert normalisiert.

3.11 Studien mit bestrahlten clgTCR⁺ YT-Zellen

3.11.1 Bestrahlung der YT-Zellen

- Blutbestrahlungsgerät OB29 (¹³⁷Cs-Quelle), Steuerungstechnik & Strahlungsschutz
Strahlungsdosis von 8 Gy/min 10 cm über der Basis (STS) GmbH, Braunschweig
(20.11.1997; -3,6% am 09.06.1999)

Die γ -Bestrahlung wurde als Methode der Wachstumsinhibition für die YT-Zellen untersucht. Als Strahlenquelle diente eine ¹³⁷Cs-Quelle. Die YT-Zellen wurden abzentrifugiert und das Zellpellet auf Eis gestellt. Um eine homogene Strahlenbehandlung zu erreichen, wurden die Zellen grundsätzlich als Pellet bestrahlt. Die Röhrchen wurden in den entsprechenden Einsätzen so positioniert, daß sich das Zellpellet 10 cm über der Basis befand. Die Strahlendosis wurde über die Bestrahlungszeit eingestellt. Nach der Bestrahlung wurden die YT-Zellen wieder auf Eis gestellt und zügig in Kultur genommen. Die Selektion der clgTCR⁺ YT-Zellen mit G418 wurde nach Bestrahlung nicht fortgesetzt.

3.11.2 Bestimmung der lethalen Strahlendosis für die YT-Zelllinie

- Trypanblaulösung (0,4% (w/v) in PBS) Sigma

Jeweils 10⁶ YT-Zellen wurden mit verschiedenen Dosen (100 – 15000 rad) γ -Strahlung bestrahlt (siehe 3.11.1). Die bestrahlten Zellen wurden im Kulturmedium resuspendiert und in Gewebekulturschalen übertragen. Die Zahl vitaler YT-Zellen wurde durch Trypanblau-Ausschluß-Färbung so lange bestimmt bis die Zellzahl wieder zunahm oder keine vitalen Zellen mehr nachweisbar waren. Bei einer geringen Zahl vitaler Zellen wurden die Zellen durch Zentrifugation angereichert, um überlebende YT-Zellen ausschließen zu können.

3.11.3 Zytotoxizität der bestrahlten scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen

Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen wurde 1, 3 und 5 Tage nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen γ -Strahlung (siehe 3.11.1) gegenüber der CEA⁺ Zelllinie MC32A in 4 h⁻⁵¹Cr-Freisetzungssassays (siehe 3.10.1) ermittelt. Um eine unspezifische strahlungsbedingte Aktivierung der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen ausschließen zu können, wurde einen Tag nach Bestrahlung der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen zusätzlich die Zelllinie MC38, die CEA⁻ Ursprungszelllinie der MC32A-Zellen, als Target untersucht. Für die Untersuchungen wurden nur vitale bestrahlte scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen als Effektorzellen eingesetzt, die zuvor mittels LymphoprepTM-Gradienten (1.077g/mL, 20 min, 1400 U/min, 20°C) von den toten Zellen getrennt wurden.

Die scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen wurden außerdem einen Tag nach Bestrahlung auf die clgTCR-Expression in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis untersucht. Die Zellen wurden wie unter 3.9.2 gefärbt. Unbestrahlte *mock*-transfizierte YT-Zellen und scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen wurden als Kontrollen eingesetzt.

3.12 Maustumormodell

3.12.1 Etablierung des Maustumormodells

– weibliche NOD/SCID-Mäuse (*nonobese diabetic/severe immunodeficiency*)

Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld

Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Weibliche NOD/SCID-Mäuse wurden unter standardisierten pathogenfreien Bedingungen (20°C, 50% relative Luftfeuchtigkeit und 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus) bei der Epo GmbH (Berlin) gehalten. 10^6 CEA⁺ MC32A-Tumorzellen (Klon 6) wurden subkutan in die rechte Seite der NOD/SCID-Mäuse implantiert. Ein Injektionsvolumen von 200 µL (PBS) wurde in keinem Experiment überschritten. Das Tumolvolumen wurde näherungsweise nach folgender Formel ermittelt:

Tumolvolumen = a x b x 0,5 cm a ... größter Durchmesser, b ... kleinster Durchmesser

Formel 3 – Berechnung des Tumorumfanges (Näherungsformel)

3.12.2 Adoptiver Transfer bestrahlter scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen zur Behandlung minimaler CEA⁺ MC32A-Tumore

Es wurden 3 Gruppen mit je 6 NOD/SCID-Mäusen gebildet, denen am Tag 0 jeweils 10^6 CEA⁺ MC32A-Zellen (Klon 6) zusammen mit 10^7 bestrahlten scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen, 10^7 bestrahlten scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen oder mit PBS subkutan injiziert wurden. Die scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen und die scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen wurden mit einer Dosis von 5000 rad bestrahlt (3.11.1). Die MC32A-Tumorzellen wurden mit den bestrahlten scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen oder den bestrahlten scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen jeweils für die gesamte Gruppe direkt vor der Injektion gemischt. Das Tumolvolumen wurde nach dem ersten Auftreten palpabler („fühlbare“) Tumore an der Injektionsstelle mindestens 2x wöchentlich gemessen (3.12.1). Nachdem das Tumolvolumen 1 cm³ (ca. 10% des Körpervolumens) überschritten hatte, wurden die Mäuse getötet. Das Überschreiten von 1 cm³ Tumolvolumen wurde als Zeitpunkt des Todes für die Überlebensanalyse (3.12.2) gewertet.

3.12.3 Adoptiver Transfer von scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen zur Bekämpfung etablierter CEA⁺ MC32A-Tumore

Am Tag 0 wurden 10^6 Zellen CEA⁺ MC32A-Zellen (Klon 6) subkutan in 12 NOD/SCID-Mäusen injiziert. Am Tag 19 hatten sämtliche Mäuse mindestens palpable MC32A-Tumore gebildet. 10^7 scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen oder 10^7 scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen, die mit 5000 rad bestrahlt worden waren (3.11.1), wurden jeweils 6 Mäusen pro Gruppe intratumoral injiziert. Das Tumolvolumen und die Auswertung erfolgten wie unter 3.12.2 beschrieben.

3.12.4 Statistik

Die kumulativen Überlebensraten (*survival analysis*) wurden mit der Statistiksoftware NCS2000 (<http://ncss.com>) analysiert. Die Module „Survival Analysis“ - „Log Rank Tests“ wurden verwendet. Aufgrund der geringen Größe der Gruppen wurden χ^2 -Tests basierend auf der Weibull-Verteilung

(Peto/Wilcoxon und Gehans/Wilcoxon) verwendet, da sie sich an unterschiedliche Verteilungen besser approximieren. Die angewendeten Tests sind Verallgemeinerungen des Mann-Whitney U-Tests. Die Daten wurden so transformiert, daß die Tage, an denen ein Tumervolumen $> 1 \text{ cm}^3$ gemessen wurde, als Zeitpunkt des Todes der jeweiligen Maus definiert wurden. Die Beobachtung der Mäuse wurde nach 90 Tagen abgebrochen, wenn kein Tumor nachgewiesen wurde. Zwei Gruppen eines Experimentes wurden als signifikant unterschiedlich angenommen, wenn der Wahrscheinlichkeit für die Identität ihrer Verteilungen $< 5\%$ ($p < 0,05$, *p-value*, *probability*) war.

3.13 Abstoßung der clgTCR⁺ YT-Zellen durch allogene Lymphozyten

3.13.1 Zytotoxizität allogener PBL und NK-Zellen gegenüber den clgTCR⁺ YT-Zellen

- NK-Zellisolationskit, BS-MACS[®]-Säule, Vario-MACS[®] Miltenyi Biotech
- Injektionsnadel G23 (0,6 mm), Dreiwegehahn Braun

Um die Sensibilität der YT-Zellen vor und nach clgTCR-Gentransfer gegenüber allogenen Lymphozyten zu untersuchen, wurden frisch isolierte humane PBL (Isolation siehe 3.2.3) mehrerer Spender als Effektorzellen gegenüber *mock*-transfizierten, scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen, scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen und scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen in 4 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassays (3.10.1) eingesetzt. Aus einem Teil der isolierten PBL wurden NK-Zellen mit dem NK-Zellisolationskit und dem Vario-MACS[®]-System nach Herstellerangaben isoliert und ebenfalls als Effektorzellen in 4 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassays gegenüber den *mock*-transfizierten YT-Zellen, scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen, scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen und scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen untersucht.

3.13.2 Zytotoxizität allogener PBL nach Kokultivierung mit bestrahlten clgTCR⁺ YT-Zellen

- AIM-V (serumfreies Lymphozytenmedium) GIBCO
- humanes AB-Serum Biowhittaker

In einer 24-*well*-Zellkulturplatte wurden pro *well* 6×10^5 PBL (Isolation siehe 3.2.3) zusammen mit 6×10^4 γ -bestrahlten (5000 rad) *mock*-transfizierten YT-Zellen, scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen oder scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen in 1 mL AIM-V / 10% AB-Serum 7 Tage kokultiviert. Anschließend wurden die unterschiedlich „stimulierten“ PBL auf ihre Zytotoxizität gegenüber *mock*-transfizierten YT-Zellen, scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen und scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen in 4 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassays (3.10.1) untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Konstruktion chimärer Immunglobulin-T-Zellrezeptoren

4.1.1 Konstruktion der CEA- und PhOx-spezifischen scFv-Fragmente

Ausgangspunkt für die Erzeugung der cIgTCR-Genkonstrukte war die Konstruktion von scFv-Fragmenten aus den variablen Regionen tumorspezifischer Antikörper. Das CEA-spezifische scFv-Fragment wurde aus den V-Regionen des humanisierten Antikörpers BW431/26 (Bosslet et al., 1988; Gussow und Seemann, 1991) durch PCR amplifiziert. Bei diesem Schritt wurden die geeigneten Restriktionsschnittstellen für die Klonierung und die Sequenzen für den *Linker*-218, der die Peptidsequenz N'-GSTSGSGKPGSGEGSTKG-C' kodiert (Whitlow et al., 1993), erzeugt. Mehrere Versuche einer „overlapping“-PCR führten zu keiner eindeutigen Bande des scFv-Fragments, obwohl eine komplementäre Überlappung von 16 bp in den 5'-Enden der „inneren“ Primer eingeplant worden war. Die V_L-Region konnte jedoch über die im *Linker*-218 enthaltene Restriktionsschnittstelle SmaI mit der V_H-Region fusioniert werden. Das resultierende scFv-Konstrukt mit der Konfiguration V_L / *Linker*-218 / V_H wurde mit **scBW431/26** bezeichnet. Das scFv-Fragment **PhOx-Yol** mit einer Spezifität für das Hapten 2-Phenyl-2-oxazolin-5-on (PhOx) sollte als Kontrollkonstrukt verwendet werden, lag jedoch in der Konfiguration V_H / *Yol-Linker* / V_L vor. Der *Yol-Linker* kodiert die Peptidsequenz N'-SGSASAPKLEEEGEFSEAR-C' mit dem Epitop für den Antikörper Yol 1/34 aus dem α -Tubulin (unterstrichen). Durch wechselseitigen Austausch der V-Regionen von scBW431/26 und PhOx-Yol wurde das scFv-Fragment **scPhOx** mit der Konfiguration V_L / *Linker*-218 / V_H und das scFv-Fragment **BW431/26-Yol** mit der Konfiguration V_H / *Yol-Linker* / V_L konstruiert. Auf diese Weise wurden zwei CEA-spezifische scFv-Konstrukte mit unterschiedlichen Konfigurationen und die entsprechenden PhOx-spezifischen Kontrollkonstrukte erzeugt (Schemata siehe **Abbildung 10**).

Die Klonierung dieser scFv-Genkonstrukte erfolgte im Plasmid pOPE51, das für die periplasmatische Expression von scFv-Fragmenten in *E. coli* eingesetzt wird. Die scFv-Konstrukte waren in diesem Vektor am N-Terminus mit der Signalsequenz der Pektatlyase aus *E. carotova* (Pel B) fusioniert, die die periplasmatische Proteinexpression in *E. coli* ermöglicht. Am C-Terminus waren die scFv-Konstrukte mit einem *c-myc*/9E10-*Tag* (N'-EQKLISEEDL-C') und einem (His)₅-*Tag* fusioniert, die der Aufreinigung und dem Nachweis dienten.

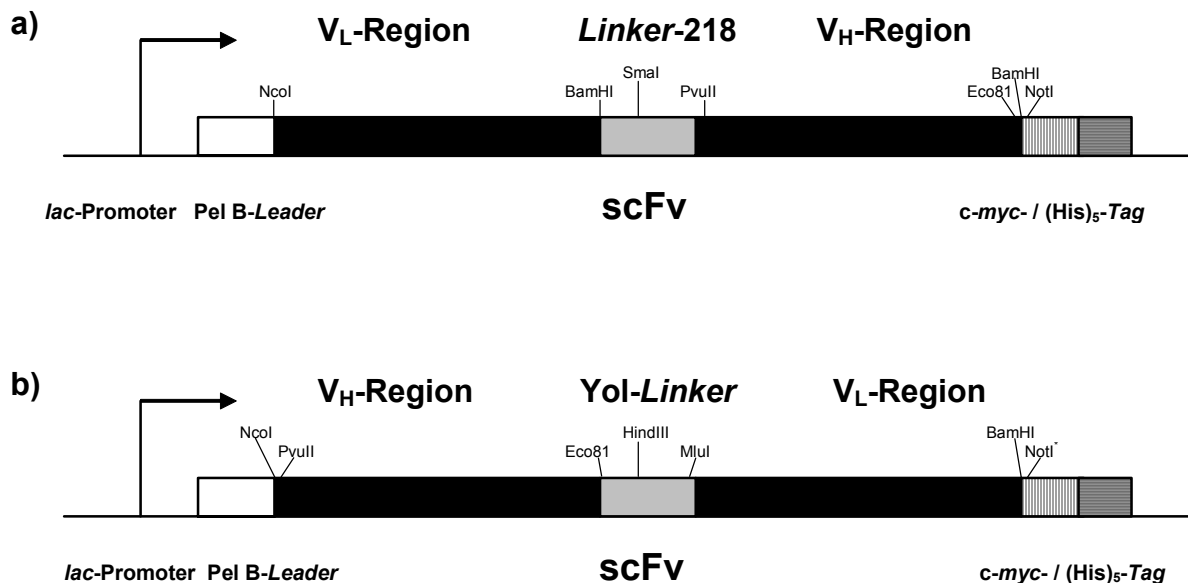


Abbildung 10 – Schemata der scFv-Konstrukte

Die Schemata zeigen den Aufbau der scFv-Konstrukte scBW431/26 und scPhOx mit der Konfiguration V_L / *Linker*-218 / V_H (a) und BW431/26-Yol und PhOx-Yol mit der Konfiguration V_H / *Yol-Linker* / V_L (b) inklusive der wichtigsten Restriktionsschnittstellen. Die scFv-Fragmente wurden in den bakteriellen Expressionsvektor pOPE51 kloniert. Die Plasmidkarte von pOPE51 ist im Anhang 0 angegeben (* nicht bei BW431/26-Yol).

Die scFv-Genkonstrukte standen im Plasmid pOPE51 unter der Kontrolle eines *lac*-Promoters, der in Gegenwart von Glykose in bestimmten *E. coli*-Stämmen reprimiert wird. Während die Verwendung der *E. coli*-Stämme DH5 α und BL21 schon an der Transformation scheiterte, konnte der *E. coli*-Stamm XL1-Blue aufgrund seiner *lacI^f*-Mutation, die eine Überexpression des *lac*-Repressors bedingt, für die Klonierung der scFv-Konstrukte eingesetzt werden, wenn 20 mM Glukose in das Inokulationsmedium und auf die Agarplatten gegeben wurde. Trotzdem wurde auch bei diesem *E. coli*-Stamm nach Transformation der pOPE51-Plasmide mit den scFv-Genkonstrukten ein verlangsamtes Wachstum beobachtet. Eine kleine Koloniengröße war sogar ein gutes Indiz für die erfolgreiche Klonierung der scFv-Fragmente, weil große Kolonien in den meisten Fällen pOPE51-Plasmide mit fehlendem oder unvollständigem scFv-*Insert* aufwiesen. Außerdem war die Ausbeute und Qualität der Plasmid-DNA relativ gering, wodurch Probleme bei der nachfolgenden Sequenzierung der scFv-Genkonstrukte auftraten. Beide Effekte wiesen auf eine unvollständige Repression des *lac*-Promoters im XL1-Blue-Stamm hin.

4.1.2 Bakterielle Expression and Bindungsanalyse der scFv-Fragmente scBW431/26, BW431/26-Yol, scPhOx und PhOx-Yol

Die scFv-Fragmente scBW431/26, BW431/26-Yol, scPhOx und PhOx-Yol wurden im *E. coli*-Stamm XL1-Blue exprimiert. Die Expression wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und bei 26 – 28°C durchgeführt. Die Zugabe von 0,4 M Saccharose in das Medium während der Expression fördert die Freisetzung periplasmatischer scFv-Proteine ins Medium und ermöglicht die Isolation der scFv-Proteine aus dem Überstand (Kipriyanov et al., 1997a).

Die beiden PhOx-spezifischen scFv-Konstrukte scPhOx und PhOx-Yol ließen sich gut mit diesem Expressionssystem produzieren und aus dem Kulturüberstand über eine Ni^{2+} -NTA-Agarosesäule aufreinigen (Abbildung 11). Die Ausbeute des scFv-Fragments scPhOx (V_L / *Linker*-218 / V_H) war mit bis zu 1 µg/mL Bakterienkultur trotz unterschiedlicher Anordnung der V-Regionen und anderer *Linker*-Sequenz mit dem scFv-Fragment PhOx-Yol (V_H / *Yol-Linker* / V_L) vergleichbar. Das aufgereinigte Protein beider scFv-Fragmente zeigte im ELISA eine spezifische Bindung an PhOx-BSA (Abbildung 12 b).

Die aus den V-Regionen des CEA-spezifischen Antikörpers BW431/26 konstruierten scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol konnten dagegen nur in sehr geringen Mengen nach bakterieller Expression aus dem Kulturüberstand isoliert werden (Abbildung 11). Außerdem konnte für die scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol nach Reinigung über die Ni^{2+} -NTA-Agarosesäule keine spezifische Bindung an CEA-Protein im ELISA nachgewiesen werden (Abbildung 12 a).

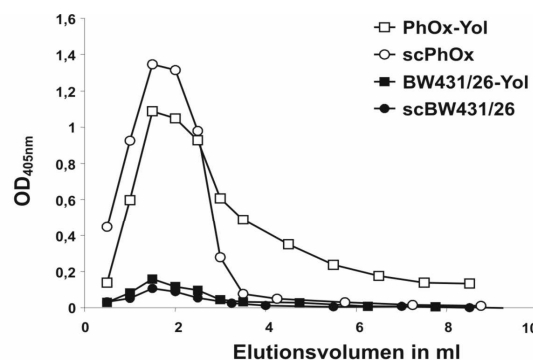


Abbildung 11 – Die scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol wurden im Gegensatz zu scPhOx und PhOx-Yol nur in geringen Mengen periplasmatisch in *E. coli* exprimiert.

Die Überstände der Bakterienkultur wurden 36 h nach Induktion der scFv-Expression geerntet. Die scFv-Proteine wurden über ihren (His)₅-Tag mit Ni^{2+} -NTA-Agarose aufgereinigt. Der Nachweis erfolgte mit dem Antikörper 9E10 gegen das *c-myc*-Epitop der scFv-Konstrukte.

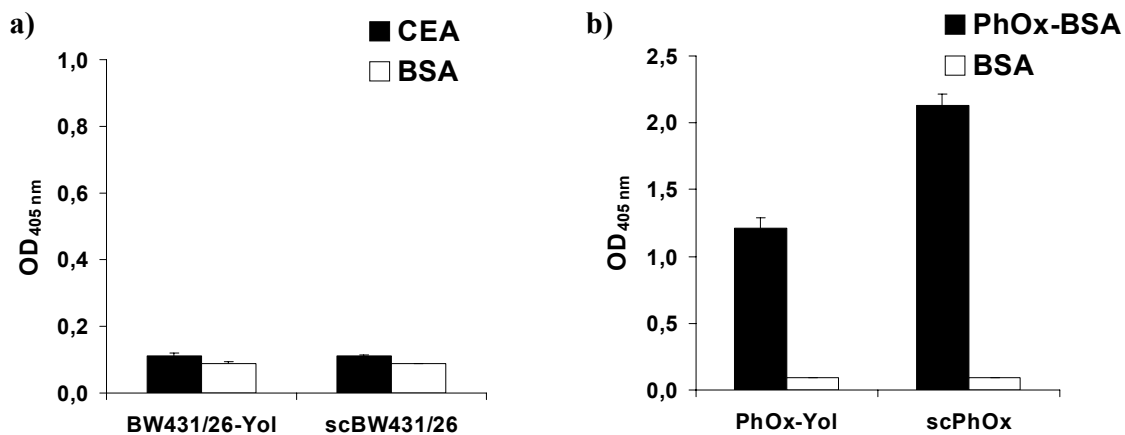


Abbildung 12 - Die scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol zeigten im Gegensatz zu scPhOx und PhOx-Yol nach bakterieller Expression keine spezifische Bindung an ihr Antigen.

Die scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol wurden nach periplasmatischer Expression in *E. coli* und nach Reinigung über eine Ni²⁺-NTA-Agarosesäule auf ihre Bindung gegenüber CEA-Protein (a) mittels ELISA analysiert. Die scFv-Fragmente scPhOx und PhOx-Yol wurden auf ihre Bindung gegenüber PhOx-BSA untersucht (b). Als Negativkontrolle wurden Ansätze mit BSA-Protein als Antigen durchgeführt. Der Nachweis der scFv-Fragmente erfolgte mit dem Antikörper 9E10.

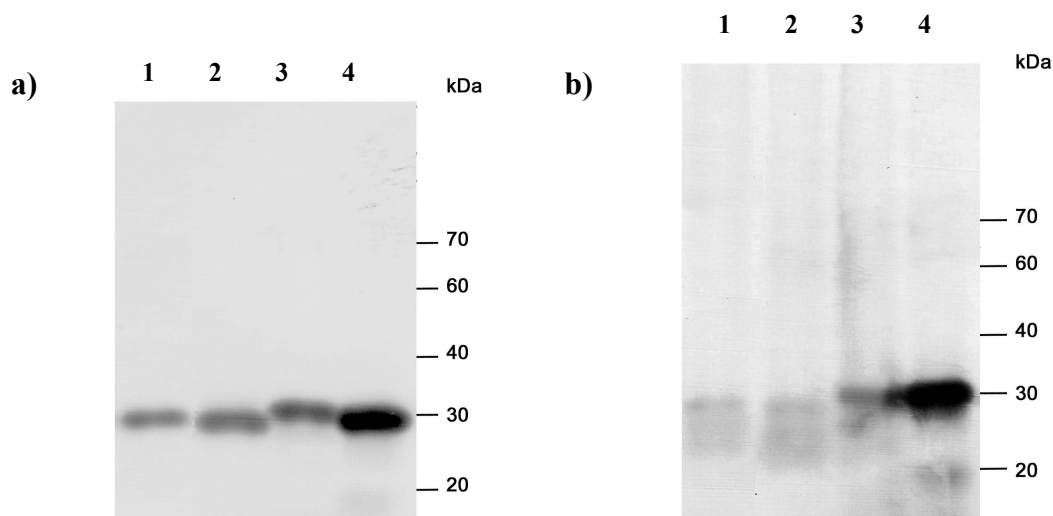


Abbildung 13 – Die scFv-Proteine scBW431/26 und BW431/26-Yol zeigten im Gegensatz zu scPhOx und PhOx-Yol keine definierte Bande nach einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE.

Nach Expression (1 mM IPTG, 4 h, 37°C) der scFv-Konstrukte scBW431/26 (Spur 1), BW431/26-Yol (Spur 2), scPhOx (Spur 3) und PhOx-Yol (Spur 4) wurden die Bakterienpellets mit reduzierendem (a) oder nichtreduzierendem SDS-Probenpuffer (b) vorbereitet und über ein 15%iges SDS-Polyacrylamid-gel aufgetrennt. Die scFv-Proteine wurden im Westernblot mit dem Antikörper 9E10 nachgewiesen.

Die Untersuchung von Bakterienlysaten mittels SDS-PAGE und Westernblot ergab für jedes scFv-Konstrukt eine einzelne Bande entsprechend dem zu erwartenden Molekulargewicht, wenn die Proben mit β -Mercaptoethanol reduziert wurden (Abbildung 13 a). Wenn die Proben unter nichtreduzierenden Bedingungen vorbereitet wurden, war nur bei den scFv-Konstrukten PhOx-Yol und scPhOx ein definierte 30 kDa-Bande erkennbar. Die scFv-Konstrukte scBW431/26 und BW431/26-Yol zeigten dagegen schwache verschmierte Banden im Bereich von 20 bis 30 kDa (Abbildung 13 b).

4.1.3 Konstruktion von scFv-hFc-Fusionsproteinen aus den scFv-Fragmenten scBW431/26 und scPhOx

Die funktionelle Expression nichtbakterieller Proteine in *E. coli* hängt von vielen Faktoren ab und ist nicht immer erfolgreich durchführbar. Deshalb wurde auf ein Expressionssystem ausgewichen, das auf der sekretorischen Expression in der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T beruhte. Die scFv-Fragmente wurden außerdem mit dem Fc-Teil (*hinge*-CH₂-CH₃) des humanen IgG1 (hFc) fusioniert. Dieser Ansatz ermöglichte die Expression und Analyse des gesamten extrazellulären Anteils der in dieser Arbeit erzeugten cIgTCR-Konstrukte, da der humane Fc-Teil in den Rezeptorkonstrukten als extrazelluläre Verbindungsdomäne zwischen scFv-Fragment und Signalkette zum Einsatz kam (Abbildung 20).

Das Plasmid pCMX (Gao und Goldfarb, 1995) wurde für die Konstruktion und Expression der scFv-hFc-Fusionsproteine verwendet. Da die scFv-Fragmente keine eigene sekretorische Signalpeptidsequenz enthielten, wurden die scFv-Konstrukte N-terminal mit dem Signalpeptid der leichten IgG κ -Kette (Persic et al., 1997) fusioniert (Abbildung 15). Die Sequenzen für diese Signalpeptide (inkl. der Restriktionsschnittstellen) wurden mit zwei Oligonukleotiden erzeugt, die bei der PCR gleichzeitig als *Template* und *Primer* dienten (Abbildung 14). Es wurden zwei unterschiedliche *Leader*-Sequenzen erzeugt, die sich in der Fusionsschnittstelle zum scFv-Fragment unterschieden. Der *Leader-A* mit seiner ScaI-Schnittstelle erforderte die *blunt-end*-Klonierung der scFv-Genkonstrukte aus dem pOPE51-Plasmid und deshalb die Entfernung des 5'-Überhangs der 5'-terminalen NcoI-Schnittstelle der scFv-Konstrukte. Der *Leader-C* enthielt dagegen eine NcoI-Schnittstelle und ermöglichte die direkte Klonierung der scFv-Genkonstrukte aus dem pOPE51-Plasmid. Dadurch wurde jedoch zwischen dem Signalpeptid und dem scFv-Fragment ein zusätzlicher Methioninrest eingefügt, der N-terminal am scFv-Fragment nach dem Abspalten des Signalpeptids durch die Signalpeptidase erhalten bleibt (HUSAR, SignalSeq, <http://genome.dkfz-heidelberg.de/>).

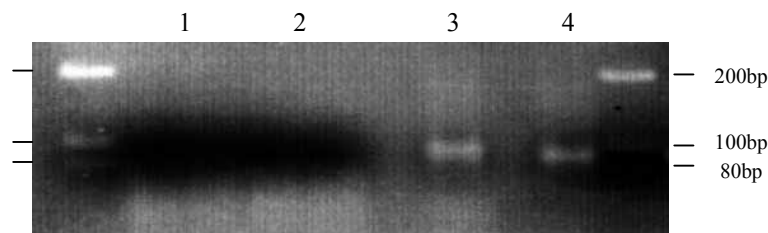


Abbildung 14 – Die cDNA-Sequenzen für die sekretorischen Signalpeptide konnten mit Oligonukleotiden erzeugt werden.

Die Spuren 3 und 4 zeigen die PCR-Fragmente von *Leader-A* und *Leader-C*. Als Kontrolle wurden PCR-Ansätze ohne Polymerase durchgeführt (Spuren 1 und 2, je 2x). *Leader-A* und *-C* basieren auf dem Signalpeptid der humanen IgG κ -Kette.

Leader A

HindIII
 BspI BglII NcoI ApaLI ScaI
 5'-GATGAAGCTTAGCAGATCTCC ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCCTGGTAGCAACAGCTACAGGC GTGCACAGT| ACTCTAC-3'
 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S -> scFv

Leader C

HindIII
 BspI BglII ApaLI NcoI
 5'-GATGAAGCTT AGCAGATCT-ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCCTGGTAGCAACAGCTACAGGC GTGCACATC|CATG GTCTG-3'
 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S M -> scFv

Abbildung 15 – Signalpeptidsequenzen für die scFv-hFc- und clgTCR-Konstrukte *Leader-A* und *Leader-C* wurden aus dem Signalpeptid der humanen IgG κ -Kette abgeleitet. Sie unterschieden sich nur in der Klonierungsstelle für das scFv-Fragment. Der *Leader-A* erfordert aufgrund seiner ScaI-Schnittstelle die *blunt-end*-Klonierung der scFv-Fragmente. Der *Leader-C* lässt dagegen eine direkte Klonierung der scFv-Fragmente aus dem pOP51-Plasmid über die NcoI-Schnittstelle zu, erzeugt aber ein zusätzliches Methionin, das nach Abspaltung des Signalpeptides am N-Terminus der scFv-Fragmente erhalten bleibt.

Die mit dem sekretorischen Signalpeptid ausgestatteten scFv-Fragmente scBW431/26 und scPhOx (V_L / *Linker*-218 / V_H) wurden an ihrem C-Terminus mit dem humanen Fc-Teil fusioniert. Die resultierenden scFv-hFc-Fusionskonstrukte wurden mit **scBW431/26-hFc** und **scPhOx-hFc** bezeichnet (Schema siehe Abbildung 20 a).

4.1.4 Expression und Analyse der Bindungseigenschaften der scFv-hFc-Fusionsproteine scBW431/26-hFc und scPhOx-hFc

Die 293T-Zellen lassen sich sehr effizient mittels der Kalziumphosphatmethode transfizieren. Die Transfektionseffizienz hing entscheidend von der Qualität des 2xHeBSP-Puffers ab. Der optimale pH-Wert des Puffers lag entgegen vieler Standardprotokolle bei $\text{pH } 6,97 \pm 0,02$.

Die scFv-hFc-Genkonstrukte wurden in die 293T-Zellen transfiziert und die Kulturüberstände mittels Immunodotblot auf die Expression der scFv-hFc-Proteine untersucht. In den Überständen wurden bis zu 40 $\mu\text{g/mL}$ scFv-hFc-Protein nachgewiesen (Abbildung 16). Die hohe Konzentration an scFv-hFc-Protein in den Kulturüberständen der transfizierten 293T-Zellen ermöglichte die direkte Untersuchung der Antigenbindungseigenschaften des scFv-hFc-Proteins durch ELISA oder FACS-Analyse. Eine Verkleinerung der Ansätze auf 6-well-Gewebekulturplatten mit einem Kulturvolumen von 3 – 5 mL je Ansatz war für die meisten Analysen ausreichend. Die 293T-Zellen ließen sich sogar mit Plasmid-DNA aus Mini-Präparationen transfizieren, so daß im Anschluß an die Klonierung viele Klone auf die Expression und Bindungseigenschaften ihrer scFv-hFc-Konstrukte getestet werden konnten.

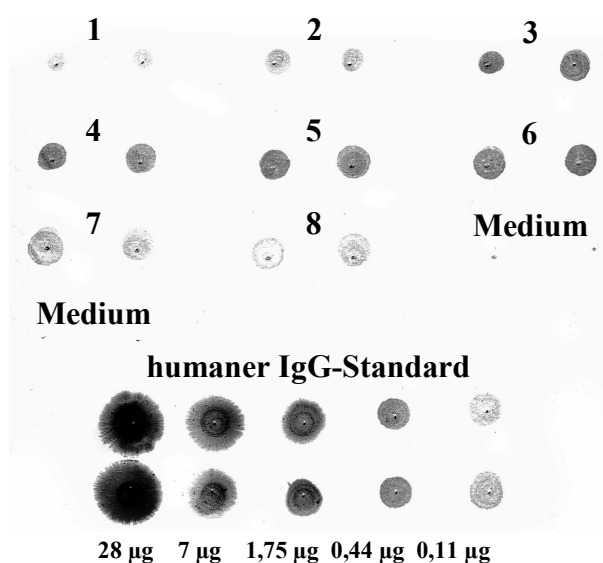


Abbildung 16 – Die scFv-hFc-Konstrukte konnten in den 293T-Zellen sekretorisch exprimiert werden.

Im oberen Teil des Dotblots wurden jeweils 10 μL der Zellkulturüberstände von 293T-Zellen, die mit den scFv-hFc-Genkonstrukten scBW431/26-hFc (1, 2, 3), scPhOx-hFc (4, 5, 6) oder scHuM195-hFc (7, 8) transfiziert waren, als Duplikate aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Medium verwendet. Im unteren Teil des Dotblots wurden Duplikate eines humanen IgG-Proteinstandards aufgetragen.

Im Gegensatz zur bakteriellen Expression des scFv-Fragments scBW431/26 konnte das scFv-hFc-Protein scBW431/26-hFc in den 293T-Zellen exprimiert werden. Im ELISA wurde unabhängig davon, ob der *Leader-A* oder der *Leader-C* in dem scBW431/26-hFc-Konstrukt verwendet wurde, eine vergleichbare und spezifische Bindung gegenüber CEA nachgewiesen (Abbildung 17 a). Das scBW431/26-hFc-Fusionsprotein wurde auch zur FACS-Analyse von CEA⁺ Tumorzelllinien eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.2).

Das auf dem PhOx-spezifischen scFv-Fragment scPhOx basierende scFv-hFc-Konstrukt scPhOx-hFc wurde ebenfalls unabhängig von dem verwendeten Signalpeptid sekretorisch in den 293T-Zellen exprimiert und zeigte eine spezifische Antigenbindung gegenüber PhOx-BSA im ELISA (Abbildung 17 b). Das scPhOx-hFc-Fusionsprotein wurde außerdem zur FACS-Analyse phOx-markierter Zelllinien und als Negativkontrolle für die anderen scFv-hFc-Proteine eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2).

Auf die Konstruktion von scFv-hFc-Fusionsproteine aus den scFv-Fragmenten BW431/26-Yol und PhOx-Yol wurde verzichtet, da eine spezifische Antigenbindung für die scFv-hFc-Proteine scBW431/26-hFc und scPhOx-hFc nachgewiesen worden war.

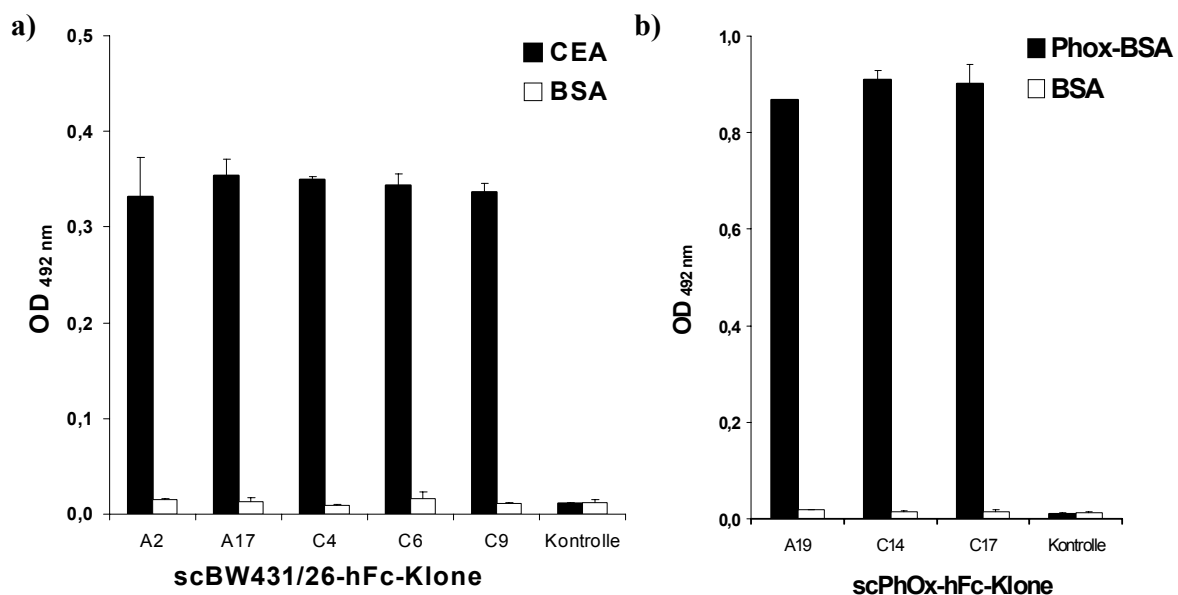


Abbildung 17 – Die scFv-hFc-Fusionsproteine scBW431/26-Fc und scPhOx-hFc zeigten eine spezifische Bindung an ihre Antigene.

Die Kulturüberstände der 293T-Zellen, die mit den Genkonstrukten für die scFv-hFc-Proteine scBW431/26-hFc (a) oder scPhOx-hFc (b) transfiziert worden waren, wurden im ELISA auf die Bindung an CEA (a) bzw. PhOx-BSA (b) getestet. Ansätze mit BSA als Antigen wurden als Negativkontrolle parallel in allen Versuchen durchgeführt. Kulturüberstände *mock*-transfizierter 293T-Zellen wurden als Kontrolle angegeben. Die scFv-hFc-Klone, die den *Leader-A* als Signalpeptid enthielten, wurden mit Ax bezeichnet, Klone mit dem *Leader-C* wurden mit Cx bezeichnet.

4.1.5 Konstruktion und Expression des scFv-hFc-Fusionsproteins scHuM195-hFc

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurde die Konstruktion des scFv-Fragments aus den V-Regionen des humanisierten CD33-spezifischen Antikörpers HuM195 nicht mehr im bakteriellen Expressionsvektor pOPE51 durchgeführt. Das scFv-Fragment **scHuM195** wurde analog zu den scFv-Fragmenten scBW431/26 und scPhOx mit der Konfiguration $V_L / \text{Linker-218} / V_H$ erzeugt und mit dem Signalpeptid *Leader-C* und dem humanen Fc-Teil im Plasmid pCMX fusioniert (Schema siehe Abbildung 20 a). Das resultierende scFv-hFc-Konstrukt wurde mit **scHuM195-hFc** bezeichnet. Das scHuM195-hFc-Protein konnte ohne Veränderungen oder Optimierungen am Expressionssystem erfolgreich in der Zelllinie 293T sekretorisch exprimiert werden. Da kein CD33-Protein für ein ELISA zur Verfügung stand, wurde das scHuM195-hFc-Protein durch FACS-Analysen von CD33⁺-Leukämiezelllinien getestet (siehe Abschnitt 4.2.3). Mit dieser Herangehensweise konnte die Konstruktion, Expression und Analyse des scFv-hFc-Konstruktes scHuM195-hFc innerhalb von zwei Wochen durchgeführt werden.

Die scFv-hFc-Fusionsproteine scBW431/26-hFc, scPhOx und scHuM195-hFc waren in proteinhaltigen Medien (DMEM / 10% FCS, AIM-V, Xvivo-15) unter sterilen Bedingungen oder nach Zugabe von 0,01% NaN₃ bei 4°C über Monate stabil und konnten in diesem Zeitraum für Immunfärbungen und andere Experimente eingesetzt werden.

4.1.6 Isolation der CD3 ζ-Kette

Die ζ-Untereinheit des CD3-Komplexes wurde aus der Gesamt-cDNA aktivierter PBL zweier nicht miteinander verwandter Probanden isoliert. Die Sequenzierung der CD3 ζ-cDNA ergab in beiden Fällen eine Basentransition (GAGGCCC → GAGCGCC) im Vergleich zur ursprünglich publizierten Sequenz der CD3 ζ-Kette (genbank:g623041, Quelle: T-Zelllinie Jurkat, Weissman et al., 1988). Die resultierende veränderte Aminosäuresequenz an Position 59 (E→D) und 60 (P→G) liegt außerhalb der für die Signaleigenschaften wichtigen ITAM-Sequenzmotive (Abbildung 19). Fünf von zehn cDNA-Klonen eines Probanden enthielten ein zusätzliches Glutaminkodon an Position 101 (Q₁₀₁). Anfänglich wurden unterschiedliche Allele vermutet. An dieser Stelle befindet sich jedoch der Spleißort für die η-Kette, so daß die Q₁₀₁-Form wahrscheinlich eine Spleißvariante (Isoform) der CD3 ζ-Kette ist. Das zusätzliche Q₁₀₁ scheint eine mangelhafte Phospholipase-C-Aktivierung zu bewirken (Atkinson et al., 2003) und wurde deshalb nicht für die cIgTCR-Konstruktion verwendet.

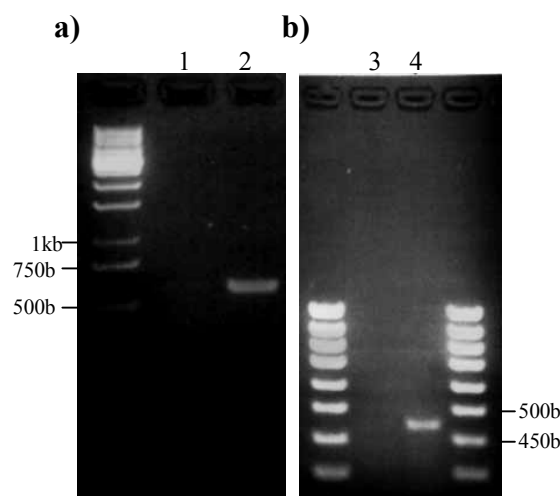


Abbildung 18 – Die Isolation der CD3 ζ-Signalkette erfolgte mit einer verschachtelten PCR.

Die cDNA der humanen CD3 ζ-Kette (a) wurde aus der Gesamt-cDNA aktivierter PBL voramplifiziert (Spur 1 - 25 Zyklen, Spur 2 - 30 Zyklen). Der zur Spur 1 gehörende PCR-Ansatz wurde 1:10 verdünnt und zur Amplifikation der Transmembrandomäne und des zytoplasmatischen Teils der CD3 ζ-Kette (b) eingesetzt (Spur 3 - 16 Zyklen, Spur 4 - 21 Zyklen).

N'- Signalpeptid	extrazelluläre Domäne	Transmembrandomäne	zytoplasmatische Domäne -C'
1	22	30	52
MKWKALFTAA ILQAQLPITE A-	-QSFGLLDPK-	-LCYLIDGILF IYGVILTALF L-	-RVKFSRSA (D→E) (G→P) PAYQQGQNQ-
71			163 (164)
-LYNEINLGR EEYDVLDKRR GRDEMGKPK(O) RRKNPQEGLY NELQDKMAE AYSEIGMKGE RRCKGHGDL YQGLSTATKD TYDALHMQAL PER			
ITAM a		ITAM b	ITAM c

Abbildung 19 – Aminosäuresequenz der humanen CD3 ζ-Kette

Der für die clgTCR-Konstrukte verwendete Anteil der CD3 ζ-Kette (**AS 28 – 163, fett**) umfaßte die Transmembrandomäne, inkl. der flankierenden positiv geladenen Aminosäuren und den gesamten zytoplasmatischen Anteil mit den drei ITAMs (a, b, c). Die ITAMs sind paarige Tyr-Phosphorylierungsmotive (**YxxL**) und rekrutieren je nach Phosphorylierungszustand zytoplasmatische Signal- und Adaptermoleküle, wie Syk und ZAP70. Unterschiede zur ursprünglich publizierten Sequenz (*genbank*) wurden angegeben. Die Q₁₀₁-Isoform wurde nicht verwendet (siehe Text).

Eine mehrtägige Aktivierung der PBL mit PHA war vor der RNA-Isolation notwendig, da sich nur sehr geringe Mengen an mRNA aus ruhenden PBL isolieren ließen. Die Amplifikation der CD3 ζ-Kette aus der Gesamt-cDNA mit Primern, die zusätzliche 5'-Sequenzen für Restriktionsschnittstellen enthielten, scheiterte. Deshalb wurde zuerst die gesamte cDNA der CD3 ζ-Kette mit einem „äußeren“ Primerpaar, das keine zusätzlichen 5'-

Sequenzen enthielt, voramplifiziert. Mit einer zweiten PCR und „inneren“ Primern konnte das cDNA-Fragment für die Transmembrandomäne und den zytoplasmatischen Teil der CD3 ζ -Kette inklusive der Restriktionsschnittstellen isoliert werden (Abbildung 18).

4.1.7 Konstruktion der chimären Immunglobulin-T-Zellrezeptoren

Die cIgTCR-Genkonstrukte wurden erzeugt, indem die scFv-hFc-Konstrukte mit der CD3 ζ -Kette fusioniert wurden (Schema siehe Abbildung 20 b). Die Klonierung erfolgte im Expressionsvektor pCDNA3. Die cIgTCR-Konstrukte wurden entsprechend ihrer extrazellulären scFv-hFc-Anteile, die die Bindungseigenschaften dieser Rezeptoren definierten, mit **scBW431/26-hFc ζ** , **scHuM195-hFc ζ** und **scPhOx-hFc ζ** bezeichnet. Damit standen zwei tumorspezifische cIgTCR-Genkonstrukte und ein Kontrollkonstrukt für die Genmodifikation der humanen NK-Zelllinie YT zur Verfügung. Das sekretorische IgG κ -Signalpeptid der scFv-hFc-Konstrukte wurde in den cIgTCR-Konstrukten weiterverwendet und ermöglichte deren Plasmamembranexpression.

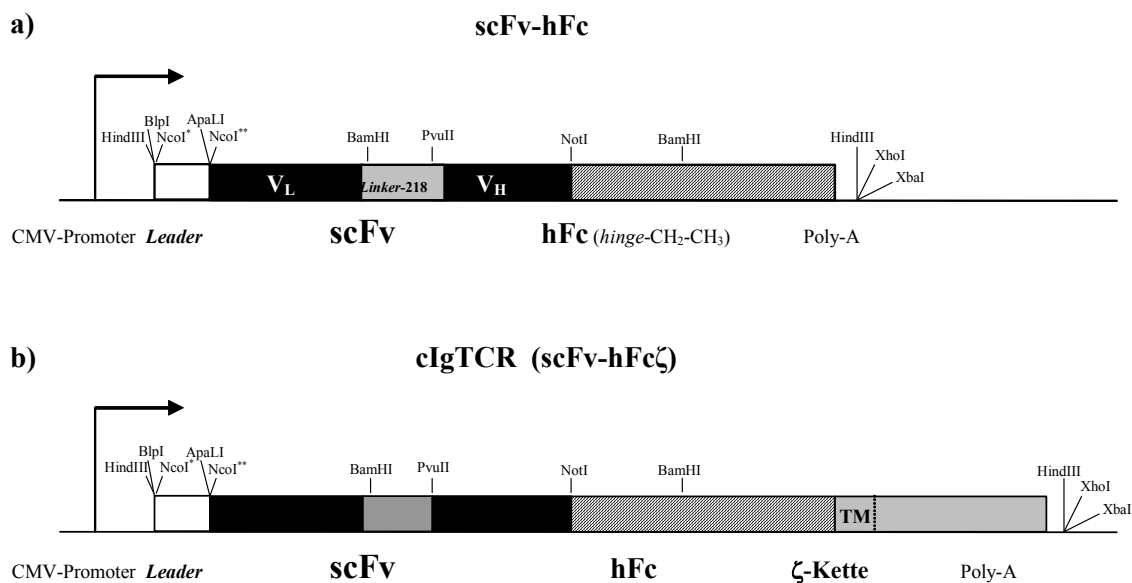


Abbildung 20 – Schemata der scFv-hFc- und der cIgTCR-Genkonstrukte

Die scFv-hFc-Fusionsproteine (a) wurden aus den scFv-Fragmenten scBW431/26, scHuM195 oder scPhOx (V_L / *Linker-218* / V_H) und dem Fc-Teil (*hinge-CH₂-CH₃*) des humanen IgG1 (hFc) konstruiert. Die cIgTCR-Konstrukte (b) wurden durch Fusion der scFv-hFc-Proteine mit der Transmembrandomäne (TM) und dem zytoplasmatischen Teil der humanen CD3 ζ -Kette konstruiert. Das Signalpeptid der humanen IgG κ -Kette (**Leader A*, ***Leader C*) wurde sowohl für die sekretorische Expression der scFv-hFc-Proteine als auch für die Plasmamembranexpression der cIgTCRs benötigt. Die Plasmidkarten für pCMX und pCDNA3 sind im Anhang angegeben.

Die Expression der cIgTCR-Genkonstrukte wurde durch Transfektion der Zelllinie 293T getestet (Abbildung 21). Der humane Fc-Teil der cIgTCR-„*Spacer*“-Domäne wurde auf einem großen Teil der transfizierten 293T-Zellen durch extrazelluläre FACS-Färbung nachgewiesen. Zusammen mit dem Nachweis der humanen CD3 ζ -Kette durch eine intrazelluläre Immunfärbung wurde die korrekte Lokalisation der cIgTCR-Konstrukte in der Plasmamembran bestätigt. Der geringere Anteil an gefärbten Zellen bei der intrazellulären FACS-Analyse wurde vermutlich durch die schlechtere Effizienz intrazellulärer Immunfärbungen verursacht.

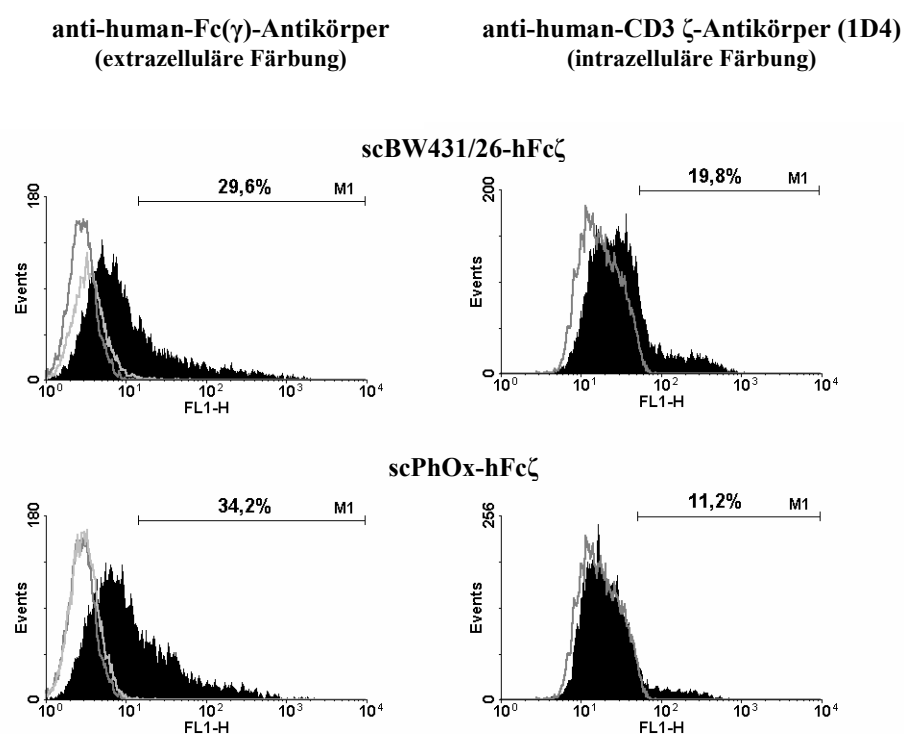


Abbildung 21 – Die cIgTCR-Konstrukte wurden nach Transfektion auf Oberfläche der 293T-Zellen exprimiert.

Die Expression der cIgTCR-Konstrukte scBW431/26-hFc ζ und scPhOx-hFc ζ wurde durch Transfektion von 293T-Zellen getestet. Die extrazelluläre Färbung der humanen Fc-„*Spacer*“-Domäne der cIgTCR-Konstrukte wurde mit einem FITC-konjugierten Ziege-anti-human-IgG-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment (linke Spalte, gefüllt) durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Färbung mit einem Ziege-anti-Maus-IgG-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment angegeben (linke Spalte, hellgrau, leer). Der intrazelluläre Anteil der cIgTCR-Konstrukte wurde mit dem Antikörper 1D4, der spezifisch für die humane CD3 ζ -Signalkette ist, nachgewiesen (rechte Spalte, gefüllt). Färbungen *mock*-transfizierter 293T-Zellen wurden als Negativkontrollen angegeben (grau, leer).

4.2 Antigenexpression auf den Tumorzelllinien

4.2.1 Färbung PhOx-markierter Zelllinien durch das scPhOx-hFc-Protein

Für das scPhOx-hFc-Protein wurde eine spezifische Bindung an PhOx-BSA im ELISA nachgewiesen (Abschnitt 4.1.4). Da das Hapten PhOx auf Zellen nicht natürlich vorkommt, konnte das scPhOx-hFc-Protein als Negativkontrolle für die Immunfärbungen mit den scFv-hFc-Proteinen scBW431/26-hFc und scHuM195-hFc eingesetzt werden. Eine spezifische Färbung durch das scPhOx-hFc-Protein wurde nur gegenüber Zelllinien erreicht, wenn deren Zelloberfläche künstlich mit dem Hapten PhOx markiert worden war (Abbildung 22).

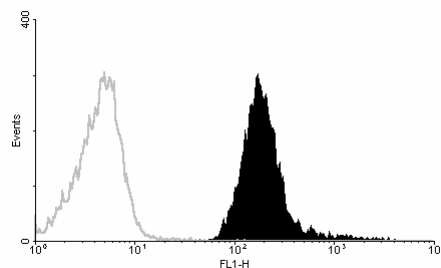


Abbildung 22 – Das scPhOx-hFc-Protein färbte spezifisch PhOx-markierte Zellen. Das scPhOx-hFc-Protein wurde zur Färbung von PhOx-markierten Zellen (gefüllt) und unbehandelten Zellen (leer) der ALL-Zelllinie Reh eingesetzt.

4.2.2 FACS-Analyse von Tumorzelllinien mit dem scBW431/26-hFc-Protein

Das CEA-spezifische scBW431/26-hFc-Protein wurde zur Analyse der CEA-Expression auf verschiedenen Tumorzelllinien verwendet. Zum Vergleich wurde der CEA-spezifische monoklonale Antikörper CEJ065 eingesetzt.

Die FACS-Analyse der CEA-transgenen Maus-Kolonkarzinomzelllinie MC32A ergab vergleichbare Ergebnisse unabhängig davon, ob die Färbungen mit dem scBW431/26-hFc-Protein oder dem Antikörper CEJ065 durchgeführt wurden (Abbildung 23). Die Intensität der Färbungen mit dem scBW431/26-hFc-Protein könnte sogar als geringfügig intensiver eingeschätzt werden. Das scBW431/26-hFc-Protein zeigte mit dem *Leader-A* oder dem *Leader-C* als Signalpeptid identische Ergebnisse bei den Immunfärbungen. Aus der MC32A-Zelllinie wurden Klone mit unterschiedlicher CEA-Expression durch „*limited-dilution*“-Klonierung isoliert. Der MC32A-Klon 6 zeigte eine höhere CEA-Expression als der MC32A-Klon 10. Die CEA⁻ Zelllinie MC38 wurde weder durch das scBW431/26-hFc-Protein noch

durch den Antikörper CEJ065 gefärbt. Diese FACS-Analysen bestätigten erneut die CEA-Spezifität des scBW431/26-hFc-Proteins aus dem ELISA.

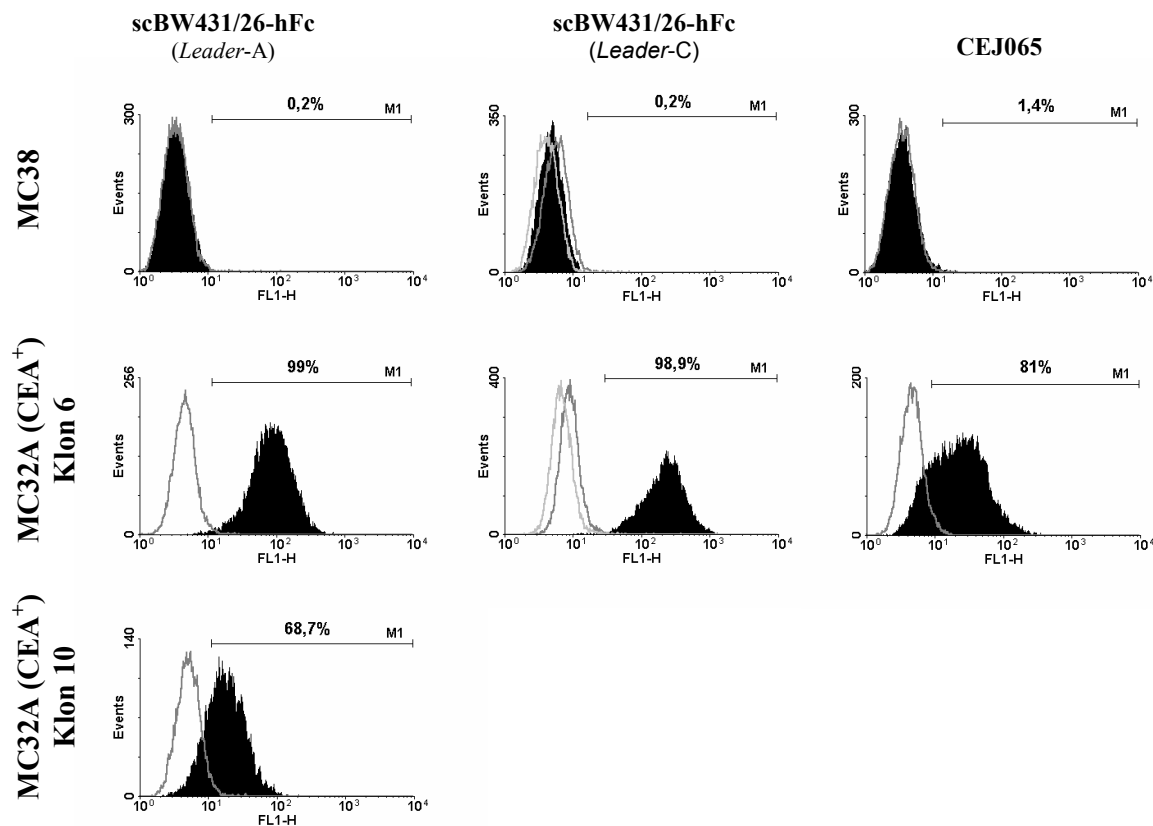


Abbildung 23 – Das scBW431/26-hFc-Protein und der Antikörper CEJ065 färbten spezifisch die CEA-transfizierte Zelllinie MC32A.

Die Maus-Kolonkarzinomzelllinie MC38 und die aus ihr abgeleiteten CEA-transfizierten MC32A-Klone 6 und 10 wurden mit dem scBW431/26-hFc-Protein (mit *Leader A* - linke Spalte; mit *Leader C* - mittlere Spalte) oder mit dem Antikörper CEJ065 (rechte Spalte) gefärbt (gefüllt). Als Negativkontrolle für das scBW431/26-hFc-Protein wurde das scPhOx-hFc-Protein mit entsprechenden *Leader*-Sequenzen (linke und mittlere Spalte: grau, leer) und das CD33-spezifische scHuM195-hFc-Protein (mittlere Spalte: hellgrau, leer) eingesetzt. Für den Antikörper CEJ065 wurde die Isotypenkontrolle angegeben (rechte Spalte: grau, leer).

Die FACS-Analyse humaner Tumorzelllinien wurden in Abbildung 24 zusammengefasst. Bei den Färbungen humaner Tumorzelllinien zeigten sich im Gegensatz zu den Untersuchungen mit den CEA-transfizierten MC32A-Zellen deutliche Unterschiede zwischen dem scBW431/26-hFc-Protein und dem Antikörper CEJ065.

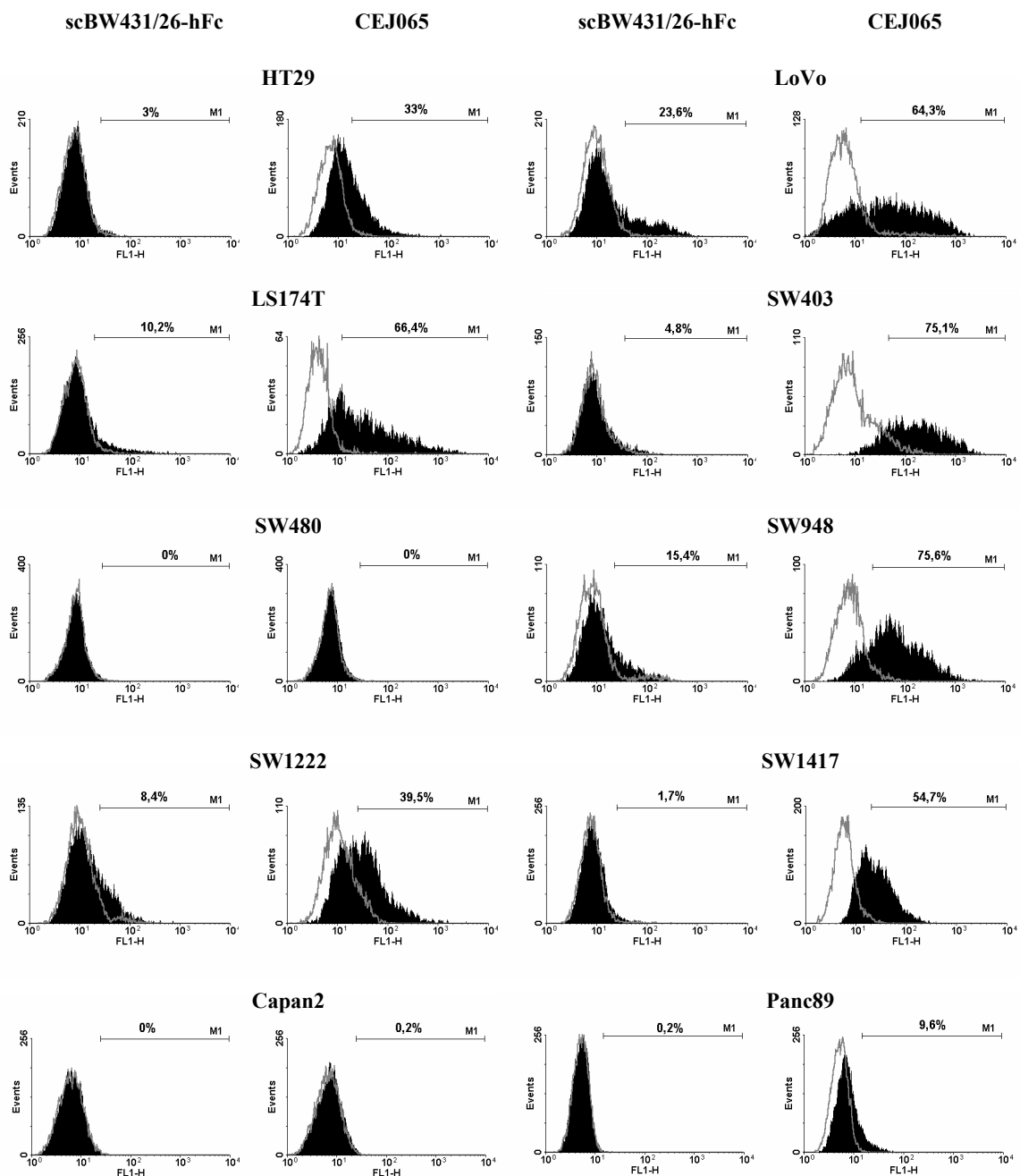


Abbildung 24 – Das scBW431/26-hFc-Protein zeigte gegenüber humanen Tumorzelllinien eine andere Spezifität als der Antikörper CEJ065.

Die Kolonkarzinomzelllinien HT29, LoVo, LS174T, SW403, SW480, SW948, SW1222 und SW1417, die Pankreaskarzinomzelllinien Capan2 und Panc89 wurden mit dem scBW431/26-hFc-Protein oder dem monoklonalen Antikörper CEJ065 gefärbt (gefüllt). Als Negativkontrollen wurden Färbungen mit dem scPhOx-hFc-Protein für das scBW431/26-hFc-Protein und Färbungen mit einem Isotypen-antikörper für den Antikörper CEJ065 angegeben (grau, leer).

Die humanen Kolonkarzinomzelllinien LoVo, LS175T, SW948 und SW1222 wurden durch das scBW431/26-hFc-Protein gefärbt, wobei der Anteil der gefärbten Tumorzellen und

die Fluoreszenzintensität in allen Versuchen deutlich geringer ausfielen verglichen mit den Färbungen, bei denen der Antikörper CEJ065 eingesetzt wurde. Die humanen Kolonkarzinomzelllinien HT29, SW403 und SW1417 wurden durch den Antikörper CEJ065 gefärbt, während das scBW431/26-hFc-Protein diese Zelllinien nur geringfügig oder gar nicht färbte. Die humane Kolonkarzinomzelllinie SW480 wurde weder durch das scBW431/26-hFc-Protein noch durch den Antikörper CEJ065 gefärbt.

Eine CEA-Expression wurde auch für andere Adenokarzinome, z. B. der Bauchspeicheldrüse, beschrieben. Deshalb wurden die Pankreaskarzinomzelllinien Capan2 und Panc89 untersucht. Die Zelllinie Panc89 wurde geringfügig durch den Antikörper CEJ065 jedoch nicht durch das scBW431/26-hFc-Protein gefärbt. Die Zelllinie Capan2 wurde weder durch das scBW431/26-hFc-Protein noch durch den Antikörper CEJ065 gefärbt.

4.2.3 FACS-Analyse von myeloischen Leukämiezelllinien mit dem scHuM195-hFc-Protein

Die Bindungseigenschaften des scHuM195-hFc-Konstruktes konnten nicht mittels ELISA getestet werden, da kein CD33-Protein zur Verfügung stand. Deshalb mußte die FACS-Analyse CD33⁺ myeloischer Leukämiezelllinien Aufschluß über Bindungsspezifität des scHuM195-hFc-Proteins geben (Abbildung 25). Zum Vergleich wurde der CD33-spezifische monoklonale Antikörper WM54 eingesetzt. Die humane AML-Zelllinie KG1 und die humane promyeloische Leukämiezelllinie HL60 wurden durch das scHuM195-hFc-Protein und den Antikörper WM54 mit vergleichbarer Intensität gefärbt. CD33⁻ Leukämiezelllinien, z. B. Raji oder K562 wurden durch das scHuM195-hFc-Protein und den Antikörper WM54 nicht gefärbt (Daten nicht gezeigt). Keine dieser Leukämiezelllinien wurde durch das PhOx-spezifische scPhOx-hFc-Protein gefärbt.

Die promyeloische Leukämiezelllinie HL60 kann durch Zugabe von DMSO zur Differenzierung stimuliert werden und granulozytäre Eigenschaften entwickeln. Die CD33-Expression wurde durch die DMSO-induzierte Differenzierung nicht beeinflusst. Es wurde außerdem keine Veränderung der Expression der MHC-Klasse-Ia-Moleküle (HLA-A/B/C) und der kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die HL60-Zellen regulierten nach DMSO-Stimulation das Integrin CD11c hoch (Abbildung 26).

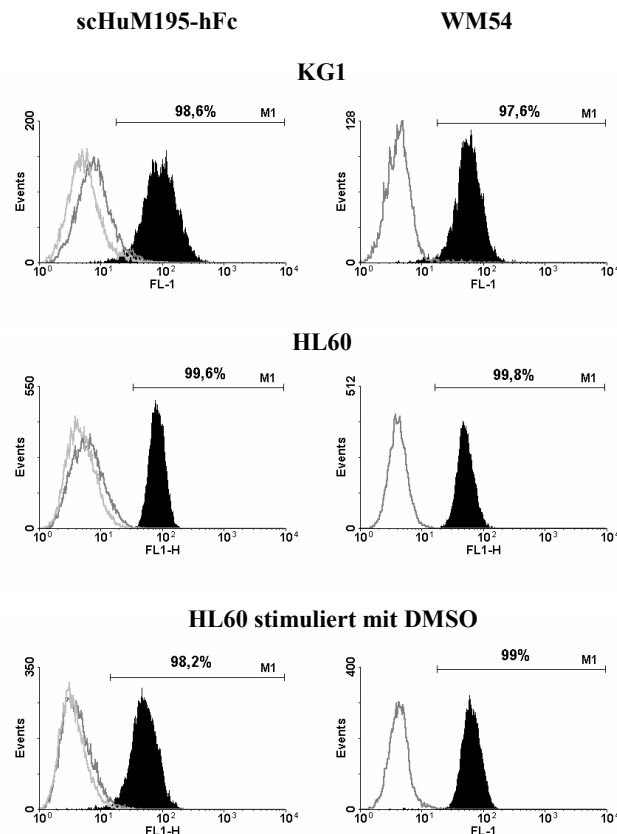


Abbildung 25 – Das scHuM195-hFc-Protein färbte spezifisch myeloische Leukämiezelllinien.

Die myeloischen Leukämiezelllinien KG1 und HL60 wurden mit dem scHuM195-hFc-Protein (linke Spalte) und dem CD33-spezifischen Antikörper WM54 (rechte Spalte) gefärbt (gefüllt). Außerdem wurden HL60-Zellen gefärbt, deren Differenzierung mit DMSO angeregt worden war. Als Negativkontrollen für das scHuM195-hFc-Protein wurden Färbungen mit dem scPhOx-hFc-Protein (linke Spalte: grau, leer) und dem scBW431/26-hFc-Protein (linke Spalte: hellgrau, leer) durchgeführt. Für den Antikörper WM54 wurde die Isotypenkontrolle (rechte Spalte: grau leer) angegeben.

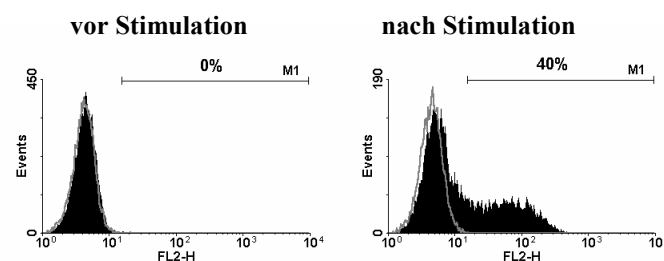


Abbildung 26 – Die HL60-Zellen regulierten nach Stimulation mit DMSO das Integrin CD11c hoch.

HL60-Zellen wurden vor und nach einwöchiger DMSO-Stimulation mit einem CD11c-spezifischen Antikörper gefärbt (gefüllt). Die Isotypenkontrolle wurde angegeben (grau, leer).

4.3 Gentransfer der cIgTCR-Konstrukte in die humane NK-Zelllinie YT

4.3.1 Elektroporation der YT-Zellen mit den cIgTCR-Genkonstrukten

Die YT-Zellen wurden erfolgreich mit den cIgTCR-Genkonstrukten durch Elektroporation transfiziert. Die höchste Transfektionsrate, entsprechend dem günstigsten Verhältnis zwischen überlebenden und transfizierten YT-Zellen, ergab sich bei 250 V und einer Kapazität von 975 μ F. Die transienten Transfektionsraten lagen 48 h nach Elektroporation bei 1 – 2% (Abbildung 27 a) und einem Anteil vitaler Zellen von 40 – 60%. Eine Linearisierung der Plasmide (z. B. mit dem Restriktionsenzym ScaI im Ampicillin-Resistenzgen der Plasmide) wirkte sich nicht vorteilhaft für eine stabile Transfektion der YT-Zellen aus, da die Transfektionseffizienz gegenüber zirkulären Plasmiden deutlich vermindert war (Daten nicht gezeigt). In den weiteren Versuchen wurde deshalb auf eine Linearisierung der Plasmide verzichtet. Nach zwei Wochen Selektion mit 500 μ g/mL G418 exprimierten 1 – 10% der YT-Zellen die cIgTCR-Konstrukte auf ihrer Oberfläche (Abbildung 27 b).

4.3.2 Immunologische Anreicherung der cIgTCR⁺ YT-Zellen

Die cIgTCR⁺ YT-Zellen konnten nach Transfektion und Selektion mit immunologischen Zellseparationsverfahren angereichert werden. Die Verwendung von biotinyliertem Ziege-anti-human-IgG-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment und magnetisch-gelabeltem Streptavidin zur Markierung der cIgTCR⁺ YT-Zellen führte bei der magnetischen Zellsortierung mit dem MACS[®]-System zu einer guten Anreicherung. Trotzdem waren einen Tag später nur noch wenige lebende cIgTCR⁺ YT-Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt konnte durch die Verwendung eines FITC-gekoppelten Ziege-anti-human-IgG-Fc γ -F(ab')₂-Fragments und eines magnetisch-gelabelten FITC-spezifischen Zweitantikörpers vermieden werden (Abbildung 27 c). Bei der durchflußzytometrischen Zellsortierung wurden die cIgTCR-transfizierten YT-Zellen mit dem FITC-konjugierten Anti-human-IgG-Fc γ -F(ab')₂-Fragment gefärbt. Die durchflußzytometrische Zelltrennung war jedoch mit einem erheblich höheren Zeitaufwand und Streß für die Zellen als bei dem MACS[®]-Verfahren verbunden. Die cIgTCR⁺ YT-Zellen wurden nach zwei Wochen erneut angereichert.

Nach zweimaliger Anreicherung exprimierten mindestens 90% der transfizierten YT-Zellen das cIgTCR-Konstrukt auf ihrer Oberfläche (Abbildung 28). Die cIgTCR-transfizierten YT-Zellen wurden auch durch den CD3 ζ -spezifischen Antikörper 1D4 intrazellulär intensiver gefärbt als die *mock*-transfizierten YT-Zellen (Abbildung 29). Nach

mehrwöchiger Kultivierung der cIgTCR⁺ YT-Zellen wurde trotz selektiver Bedingungen (500 µg/mL G418) eine Abnahme der cIgTCR-Expression beobachtet (Daten nicht gezeigt), die durch eine erneute Zellseparation korrigiert werden konnte.

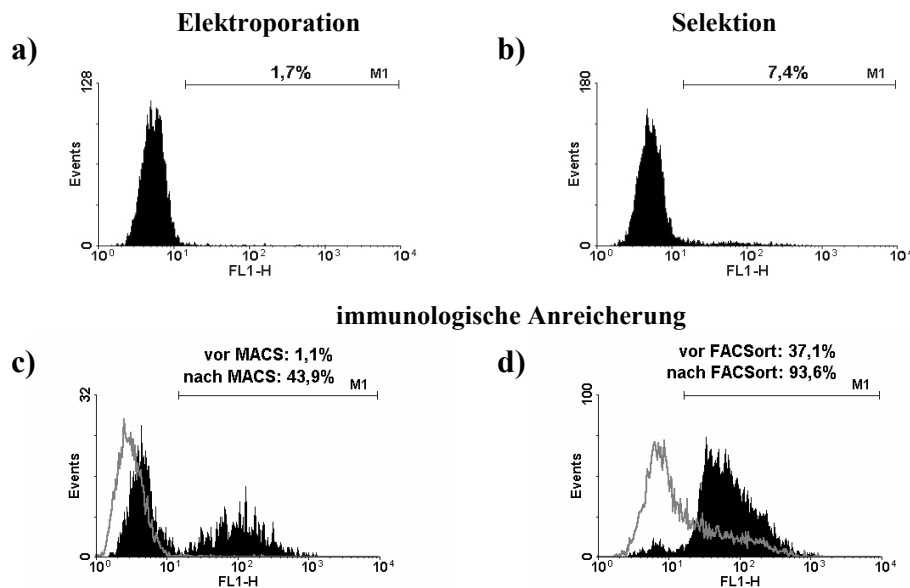


Abbildung 27 – Der Gentransfer der cIgTCR-Konstrukte in die YT-Zellen erfolgte durch Elektroporation, Selektion und immunologische Anreicherung.

Die Abbildung zeigt die Expression des cIgTCR-Konstruktes scHuM195-hFcζ auf den YT-Zellen 48 h nach Elektroporation (a) und nach zweiwöchiger Selektion mit G418 (b). Außerdem wurde die erste immunologische Anreicherung der scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen durch MACS® (c) und die zweite Anreicherung mit einem Hochleistungs-FACS-Sorter (c) dargestellt. Die Färbungen vor (grau, leer) und nach (gefüllt) der Zellseparation wurden angegeben. Die FACS-Analysen wurden mit einem FITC-konjugierten Ziege-anti-human-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment durchgeführt.

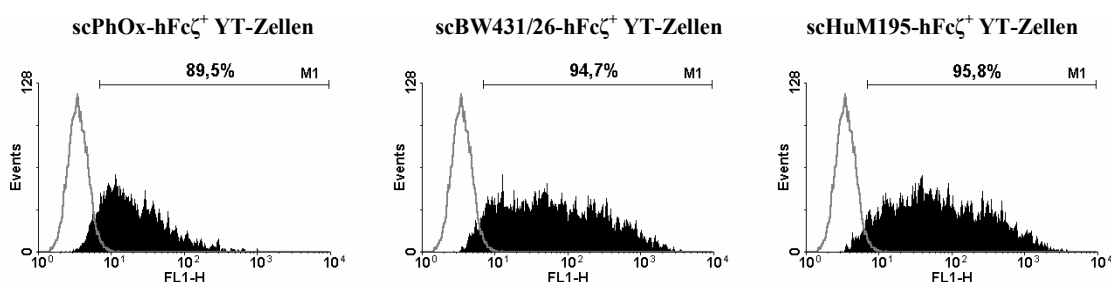


Abbildung 28 – Über 90% der cIgTCR-transfizierten YT-Zellen exprimierten nach zweifacher immunologischer Anreicherung ihr cIgTCR-Konstrukt auf der Oberfläche. Nach zweifacher immunologischer Anreicherung wurden die cIgTCR-Konstrukte scPhOx-hFcζ, scBW431/26-hFcζ und scHuM195-hFcζ auf den cIgTCR-transfizierten YT-Zellen durch Färbung mit einem FITC-konjugierten Ziege-anti-human-Fc(γ)-F(ab')₂-Fragment untersucht (gefüllt). Als Negativkontrolle wurde die Färbung *mock*-transfizierter YT-Zellen angegeben (leer).

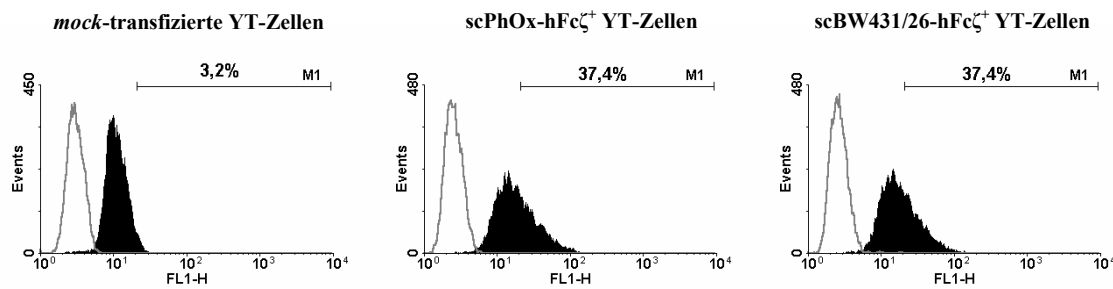


Abbildung 29 – Die Expression der CD3 ζ -Kette war in den clgTCR⁺ YT-Zellen erhöht.

Die CD3 ζ -Kette wurde durch intrazelluläre Färbung von *mock*-transfizierten YT-Zellen, scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen und scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen mit dem Antikörper 1D4 analysiert (gefüllt). Die *mock*-Kontrolle zeigt die endogene Expression der ζ -Kette der YT-Zellen. Die Isotypenkontrollen wurden angegeben (leer).

4.4 Zytotoxizitätsstudien mit den clgTCR⁺ YT-Zellen

4.4.1 Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen

Das Ziel des Gentransfers tumorspezifischer clgTCR-Genkonstrukte in die NK-Zelllinie YT war die spezifische Lyse von Tumorzellen zu erreichen. Deshalb wurden die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen, die mit dem CEA-spezifischen clgTCR-Konstrukt transfiziert waren, auf ihre Zytotoxizität gegenüber Tumorzelllinien getestet, deren CEA-Expression mit dem scBW431/26-hFc-Protein untersucht worden war (siehe Abschnitt 4.2.2).

Die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen erzielten eine Lyse von bis zu 50% gegenüber der CEA-transfizierten Tumorzelllinie MC32A (Abbildung 30). Die Lyseaktivität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen war auch bei einem kleinen E : T-Verhältnis von 1,6 : 1 sehr effizient und betrug noch bis zu 40%. Bei E : T-Verhältnissen $> 12,5 : 1$ wurde in den meisten Versuchen keine weitere Zunahme der Lyse beobachtet. Die durch die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen vermittelte Zytotoxizität war von der Höhe der CEA-Expression auf den MC32A-Zellen abhängig. Der MC32A-Klon 6 mit einer hohen CEA-Expression wurde bei einem E : T-Verhältnis von 12,5 : 1 zu 50% durch die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen lysiert, während der MC32A-Klon 10, der geringe bis mittlere CEA-Level exprimierte, bei diesem E : T-Verhältnis zu 40% lysiert wurde (Abbildung 30 a, b). Die nichtklonierten MC32A-Zellen, die eine CEA⁻ Subpopulation enthielten, wurden in Abhängigkeit vom Anteil CEA⁺ MC32A-Zellen von den scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen lysiert (Daten nicht gezeigt).

Die als Effektorzellkontrolle eingesetzten *mock*-transfizierten YT-Zellen und scPhOx-hFc ζ ⁺ YT-Zellen wiesen keine Zytotoxizität gegenüber den CEA⁺ MC32A-Zellen auf. Die mit dem CD33-spezifischen cIgTCR-Konstrukt scHuM195-hFc ζ transfizierten YT-Zellen zeigten ebenfalls keine Lyseaktivität gegenüber den CEA⁺ MC32A-Zellen. Die CEA⁻ Ursprungszelllinie der MC32A-Zellen, die Zelllinie MC38, wurde weder von den scBW431/36-hFc ζ ⁺ YT-Zellen noch von den verschiedenen Kontrolleffektorzellen lysiert.

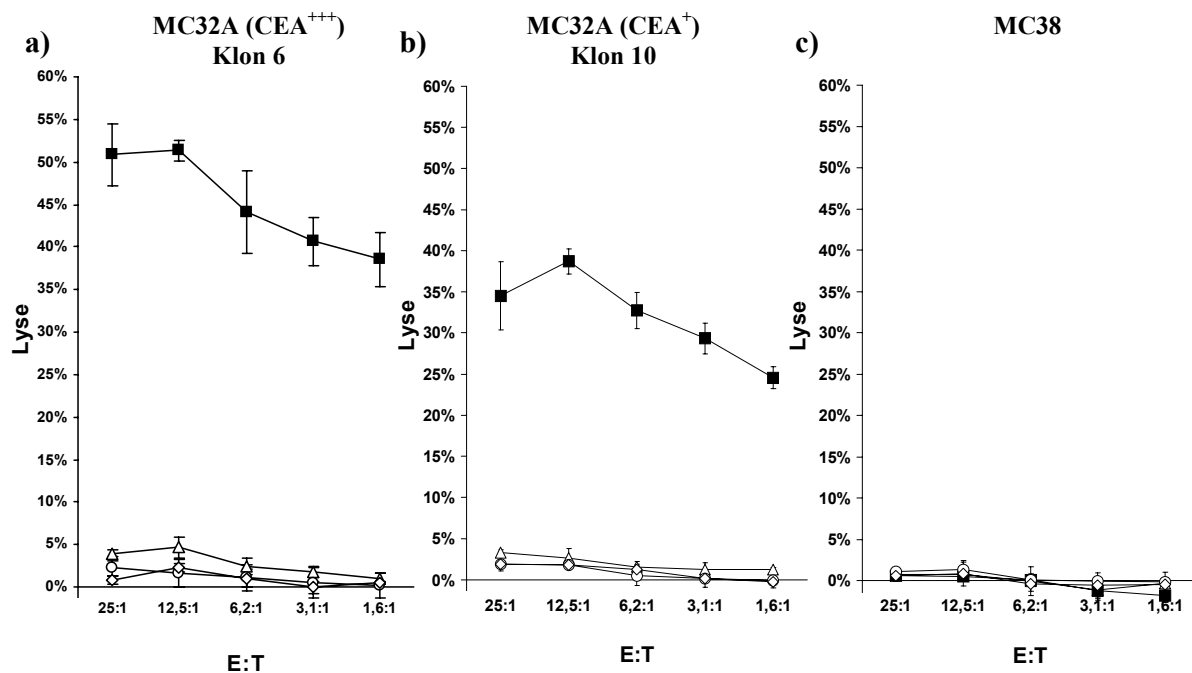


Abbildung 30 – Die scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen vermittelten eine spezifische und effiziente Lyse der CEA-transfizierten Zelllinie MC32A.

Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen (■) wurde mittels 6 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassays gegenüber der Maus-Kolonkarzinomzelllinie MC38 (c) und den aus ihr abgeleiteten CEA-transfizierten MC32A-Zellklonen, Klon 6 (a) und Klon 10 (b), untersucht. Bei den Kontrollansätzen wurden *mock*-transfizierte YT-Zellen (○), PhOx-spezifische scPhOx-hFc ζ ⁺ YT-Zellen (△) und CD33-spezifische scHuM195-hFc ζ ⁺ YT-Zellen (◇) als Effektorzellen eingesetzt. Die Targetzelllyse wurde mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben.

Die scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen zeigten gegenüber den humanen Kolonkarzinomzelllinien LoVo, LS174T, SW948 und SW1222 eine spezifische Zunahme der Zytotoxizität (Abbildung 31) verglichen mit den *mock*-transfizierten YT-Zellen und den scPhOx-hFc ζ ⁺ YT-Zellen. 10 – 15% der Zellen dieser Kolonkarzinomzelllinien wurden durch die scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen lysiert. Die Lyse dieser humanen Tumorzelllinien durch die scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen lag in der Größenordnung des Anteils der Zellen, die bei den FACS-Analysen durch das scBW431/26-hFc-Protein gefärbt worden waren (siehe Abschnitt 4.2.2).

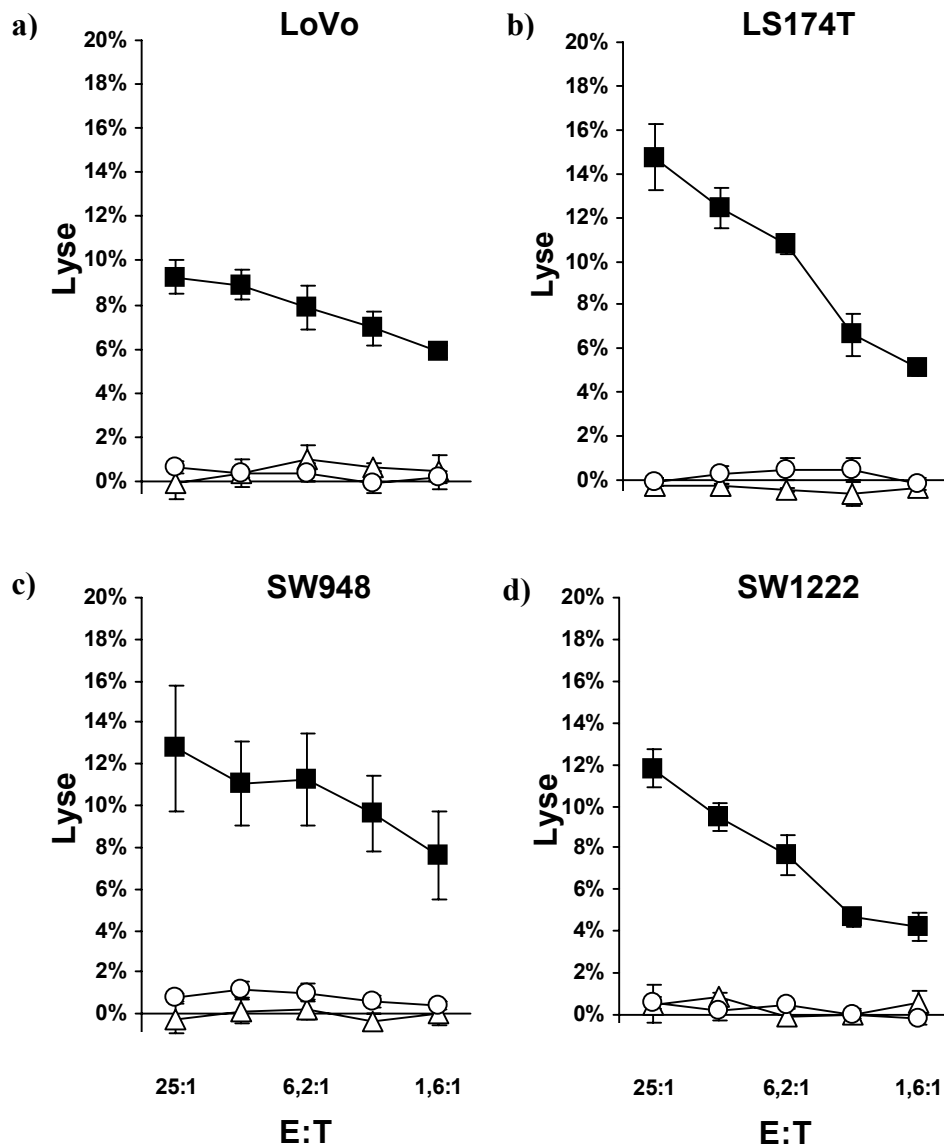


Abbildung 31 – Die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen lysierten spezifisch humane Kolonkarzinomzelllinien, die durch das scBW431/26-hFc-Protein gefärbt werden konnten. Die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen (■) wurden mit 6 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassays auf ihre Zytotoxizität gegenüber den humanen Kolonkarzinomzelllinien LoVo (a), LS174T (b), SW948 (c) und SW1222 (d) untersucht. Mock-transfizierte YT-Zellen (○) und scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen (△) wurden als Kontroll-effektorzellen in parallel durchgeführten Ansätzen eingesetzt. Die Targetzellyse wurde mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben.

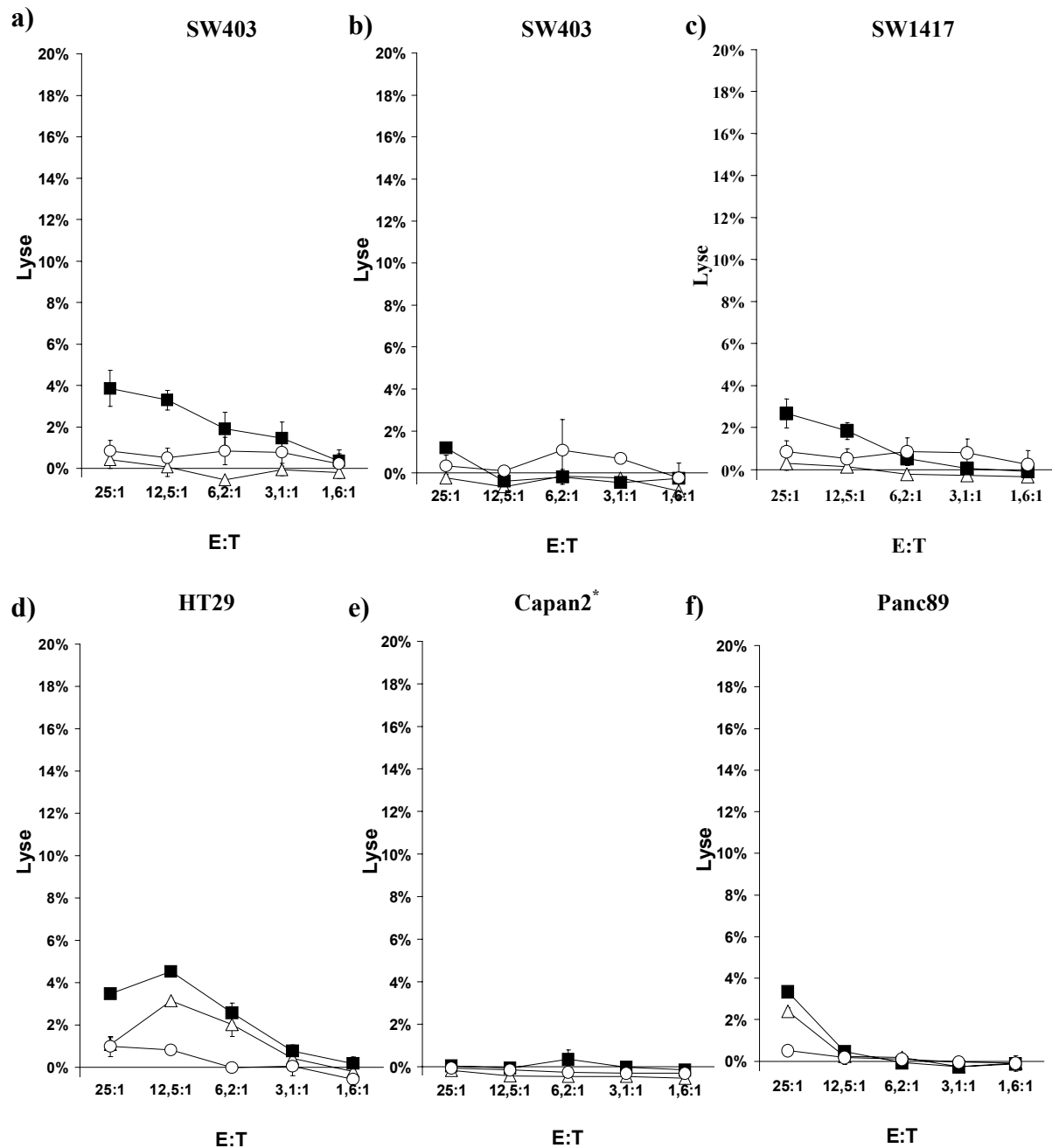


Abbildung 32 - Die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen zeigten keine Zytotoxizität gegenüber humanen Tumorzelllinien, die nicht mit dem scBW431/26-hFc-Protein gefärbt werden konnten.

Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen (■) wurden in 6 h- ^{51}Cr -Freisetzungssays gegenüber den humanen Kolonkarzinomzelllinien SW403 (a), SW480 (b), SW1417 (c), HT29 (d) und der humanen Pankreaskarzinomzelllinien Capan2* (f) und Panc89 (g) untersucht. Mock-transfizierte YT-Zellen (○) und scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen (Δ) wurden in parallelen Ansätzen als Kontrolleffektorzellen eingesetzt. Die Targetzellyse wurde mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben (*nur 4 h- ^{51}Cr -Freisetzungssay).

Gegenüber den humanen Kolonkarzinomzelllinien SW403, SW480, SW1417 und HT29 konnte keine oder nur eine geringe Zytotoxizität durch die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 32 a – d). Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen korrelierte auch bei diesen humanen Kolonkarzinomzelllinien mit den Ergebnissen der FACS-Analysen, bei denen das scBW431/26-hFc-Protein zur Färbung der Tumorzellen eingesetzt worden war (siehe Abschnitt 4.2.2). Gegenüber den Zelllinien SW403, SW1417 und HT29 wurde eine Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen von maximal 2 – 4% ermittelt. Gegenüber der Zelllinie SW480 wurde keine Lyse durch die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen festgestellt. In den parallel durchgeführten Kontrollansätzen, in denen die *mock*-transfizierten YT-Zellen und die scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen als Effektorzellen eingesetzt wurden, konnte gegenüber allen untersuchten humanen Kolonkarzinomzelllinien keine Zytotoxizität nachgewiesen werden.

Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde auch gegenüber den humanen Pankreaskarzinomzelllinien Capan2 und Panc89 getestet, die in den FACS-Analysen nicht durch das scBW431/26-hFc-Protein gefärbt worden waren (siehe Abschnitt 4.2.2). Beide Tumorzelllinien wurden weder durch die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen noch durch die *mock*- und scPhOx-hFc ζ^+ -transfizierten YT-Zellen lysiert (Abbildung 32 e, f).

4.4.2 Zytotoxizität der scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen

Die mit dem CD33-spezifischen cIgTCR-Genkonstrukt transfizierten scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen vermittelten gegenüber der CD33 $^+$ AML-Zelllinie KG1 eine Lyse von bis zu 15% (Abbildung 33 a). Die scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen zeigten dagegen nur eine sehr geringe Lyse von 3% gegenüber der promyeloischen Leukämiezelllinie HL60 (Abbildung 33 b), obwohl die HL60-Zellen wie die KG1-Zellen eine hohe CD33-Expression aufwiesen, die durch Färbung mit dem scHuM195-hFc-Protein ermittelt wurde (siehe 4.2.3). Trotzdem war ein geringfügiger Anstieg der Lyse verglichen mit den parallel durchgeführten Kontrollansätzen zu beobachten, bei denen *mock*-transfizierte YT-Zellen und scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen als Effektorzellen eingesetzt wurden. Diese Effektorzellkontrollen zeigten keine Zytotoxizität gegenüber den untersuchten myeloischen Leukämiezelllinien. Nach Stimulation der HL60-Zellen mit DMSO zur Differenzierung granulozytärer Eigenschaften konnte eine leichte Erhöhung der Lyse durch die scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen nachgewiesen werden, die sich jedoch mit zunehmenden E : T-Verhältnissen nicht deutlicher manifestierte. Die *mock*-transfizierten YT-Zellen und scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen vermittelten auch gegenüber den DMSO-stimulierten HL60-Zellen keine Lyse (Abbildung 33 c).

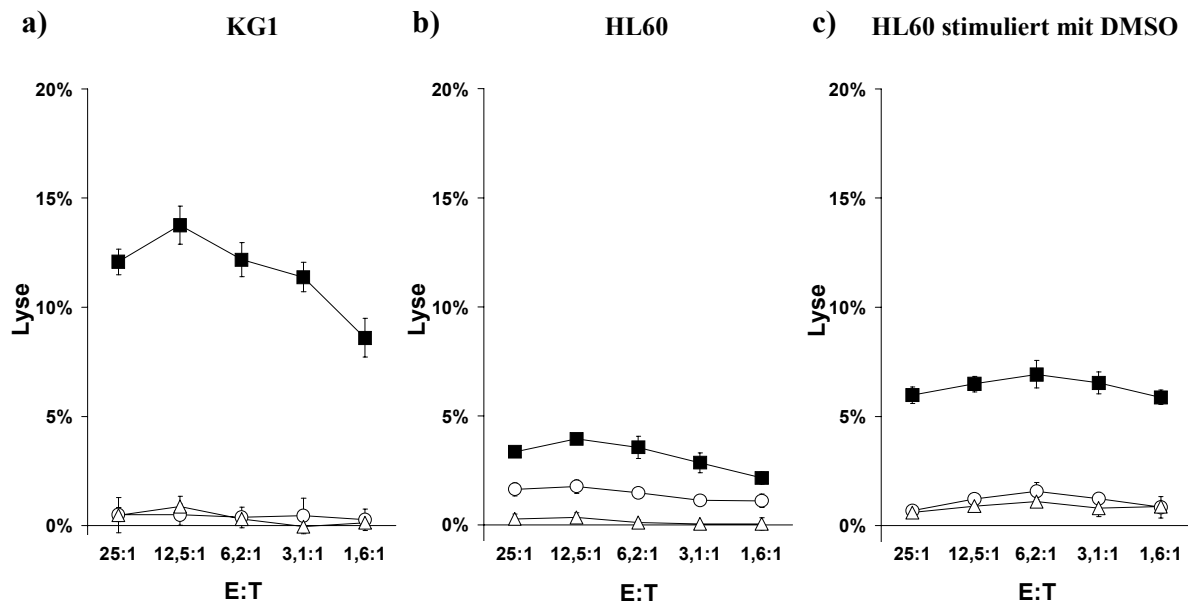


Abbildung 33 – Die scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen vermittelten eine spezifische, aber geringe Zytotoxizität gegenüber CD33 $^+$ Leukämiezelllinien.

Die scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen (■) wurden in 6 h- ^{51}Cr -Freisetzungssays auf ihre Zytotoxizität gegenüber den CD33 $^+$ Leukämiezelllinien KG1 (a) und HL60 (b) untersucht. Außerdem wurden HL60-Zellen getestet, deren Differenzierung mit DMSO stimuliert worden war (c). Parallel wurden Ansätze mitgeführt, in denen *mock*-transfizierte YT-Zellen (○) oder scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen (Δ) als Effektorzellen eingesetzt wurden. Die Targetzellyse wurde mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben.

4.4.3 Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen

In den vorangegangenen Zytotoxizitätsstudien wurden die scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen, die mit dem PhOx-spezifischen cIgTCR-Konstrukt transfiziert waren, als Kontrolleffektorzellen eingesetzt. Um die Funktion des cIgTCR-Konstruktes scPhOx-hFc ζ in diesen gen-modifizierten YT-Zellen zu überprüfen, wurde eine Targetzelllinie mit dem Hapten PhOx künstlich markiert, da dieses Hapten auf Zellen nicht natürlich vorkommt. Es konnte gezeigt werden, daß die scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen spezifisch die PhOx-markierten Zellen der ALL-Zelllinie Reh lysierten, während keine Zytotoxizität gegenüber den unbehandelten Zielzellen beobachtet wurde (Abbildung 34). Im Gegensatz zu den scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen vermittelten die CEA-spezifischen scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen keine Lyse gegenüber den PhOx-markierten Zielzellen. Bei diesen Versuchen wurde ein nichtradioaktiver durchfluß-zytometrischer Zytotoxizitätsassay eingesetzt.

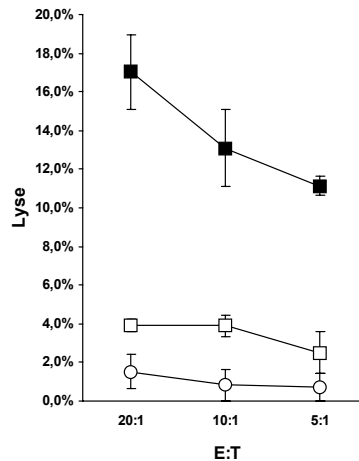


Abbildung 34 – Die scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen lysierten spezifisch PhOx-markierte Zellen.

Die scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen wurden mit einem durchflußzytometrischen Zytotoxizitätsassay gegenüber PhOx-markierten (■) und unbehandelten (□) Zellen der ALL-Zelllinie Reh auf ihre Zytotoxizität untersucht. Zum Vergleich wurden die CEA-spezifischen scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen gegenüber PhOx-gelabelten Reh-Zellen (○) getestet. Die Targetzellyse wurde mit den Standardabweichungen angegeben.

4.4.4 Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen in Gegenwart von gelöstem CEA-Protein

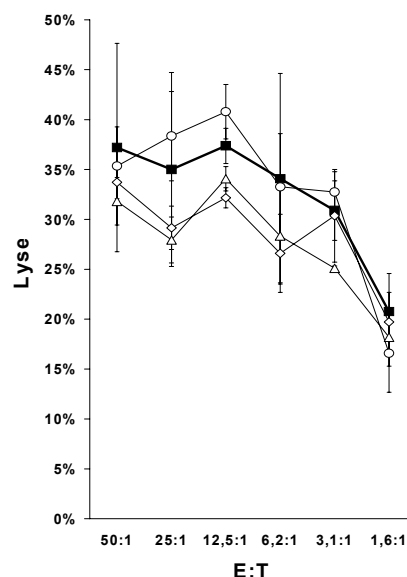


Abbildung 35 – Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde nicht durch gelöstes CEA-Protein gehemmt.

Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde in Gegenwart von 0,1 µg/mL (◇), 1 µg/mL (Δ) und 10 µg/mL (○) gelöstem CEA-Protein im Medium gegenüber der CEA⁺ Zelllinie MC32A in einem 6 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassay untersucht. Bei der Kontrolle (breite Linie, ■) wurde dem Medium kein CEA-Protein zugesetzt. Die Targetzellyse wurde mit den Standardabweichungen angegeben.

Die Bindungsdomänen von Antikörpern und Antigenrezeptoren können durch gelöstes Antigen blockiert werden. Deshalb konnte auch die Zytotoxizität der cIgTCR-transfizierten YT-Zellen in Gegenwart von freiem Antigen im Medium gehemmt werden. Die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurden auf ihre Zytotoxizität gegenüber CEA $^+$ Tumorzellen in Gegenwart von gelöstem CEA untersucht, da CEA häufig im Serum von Kolonkarzinompatienten in Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/mL}$ nachgewiesen wird. Eine Blockierung der Lyse-eigenschaften der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen hätte deshalb eine besondere Relevanz für die Behandlung von CEA $^+$ Tumoren. Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen gegenüber den CEA $^+$ MC32A-Tumorzellen wurde nicht in Gegenwart von bis zu 10 $\mu\text{g/mL}$ an gelöstem CEA-Protein inhibiert (Abbildung 35).

4.4.5 Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen in Gegenwart von gelöstem PhOx-BSA-Protein mit einzelnen oder multiplen PhOx-Gruppen

Der Einfluß von gelöstem Antigen auf die Zytotoxizität cIgTCR-transgener Effektorzellen könnte davon abhängen, ob die gelösten Antigenmoleküle über einzelne oder multiple Bindungs epitope für das cIgTCR-Konstrukt verfügen. Aus diesem Grund wurde BSA mit einem zweifachen und einem 20-fachen molaren Überschuß an PhOx markiert, um Antigenmoleküle mit einzelnen und multiplen Epitopen zu erhalten.

Während das (PhOx) $_{20}$ -BSA schon ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/mL}$ eine starke inhibitorische Wirkung auf die Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen gegenüber PhOx-markierten Zielzellen ausübte, war noch keine Hemmung durch das (PhOx) $_2$ -BSA bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ zu beobachten (Abbildung 36). Höhere Antigenkonzentrationen wurden nicht untersucht. Unbehandeltes BSA-Protein zeigte bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ keinen Einfluß auf die Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen. Das gelöste (PhOx) $_{20}$ -BSA mit den multiplen PhOx-Gruppen hatte eine mindestens 100-fach stärkere inhibitorische Wirkung auf die Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen als das gelöste (PhOx) $_2$ -BSA. Nach Berücksichtigung der Anzahl PhOx-Gruppen auf den gelösten Antigenmolekülen war die inhibitorische Wirkung des gelösten (PhOx) $_{20}$ -BSA noch um den Faktor 10 größer als die des gelösten (PhOx) $_2$ -BSA.

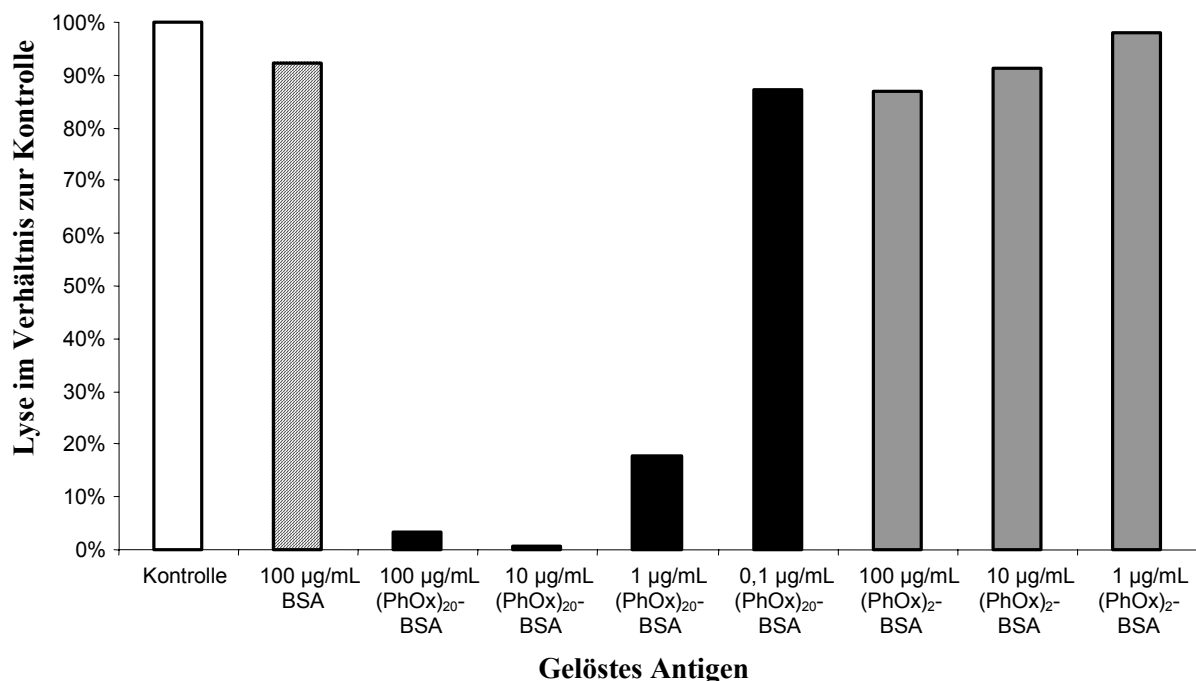


Abbildung 36 – Gelöstes Antigen mit multiplen PhOx-Gruppen hemmte die Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen bei geringeren Konzentrationen als Antigen mit einzelnen PhOx-Gruppen.

Die Zytotoxizität scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde gegenüber PhOx-markierten Zellen der ALL-Zelllinie Reh in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an freiem PhOx-BSA mit einzelnen PhOx-Gruppen (grau) und multiplen PhOx-Gruppen (schwarz) untersucht. Im Diagramm wurde die Lyse (E : T = 10 : 1) im Verhältnis zur Kontrolle (= 100%), bei der kein gelöstes Antigen dem Medium hinzugefügt wurde (weiß), angegeben. Außerdem wurde ein Ansatz mit unbehandeltem 100 µg/mL BSA-Protein (schraffiert) durchgeführt.

4.4.6 Bindungsinhibition des scPhOx-hFc-Proteins in Gegenwart von freiem PhOx-BSA mit einzelnen oder multiplen PhOx-Gruppen

Die Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen war gegenüber PhOx-markierten Zielzellen nur in Gegenwart von gelöstem PhOx-BSA mit multiplen PhOx-Gruppen inhibiert worden. Deshalb wurde untersucht, wie sich das scPhOx-hFc-Protein in Gegenwart von freiem (PhOx)₂₀-BSA und (PhOx)₂-BSA verhält (Abbildung 37).

Aufgrund der unterschiedlichen Zahl an PhOx-Gruppen auf den Antigenmolekülen (PhOx)₂-BSA und (PhOx)₂₀-BSA war auch die Anzahl der Bindungsstellen für das scPhOx-hFc-Protein nach dem „Coating“ der ELISA-Platten mit (PhOx)₂-BSA- bzw. (PhOx)₂₀-BSA-Protein sehr verschieden. Deshalb wurden die Meßergebnisse der Bindungsstudie ins Verhältnis zur 100%igen Bindungsrate des scPhOx-hFc-Proteins an das oberflächen-gebundene Antigen gesetzt. Die 100%-Bindungsrate des scPhOx-hFc-Proteins wurde jeweils

getrennt für oberflächengebundenes $(\text{PhOx})_2\text{-BSA}$ und $(\text{PhOx})_{20}\text{-BSA}$ in den Ansätzen ermittelt, in denen kein freies Antigen eingesetzt wurde.

Das gelöste $(\text{PhOx})_{20}\text{-BSA}$ bewirkte bei einer 50 – 100-fach geringeren Konzentration die Hemmung der Antigenbindung des scPhOx-hFc-Proteins als das gelöste $(\text{PhOx})_2\text{-BSA}$. Eine 50%ige Bindungsinhibition des scPhOx-hFc-Proteins wurde in Gegenwart von $1 - 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ an gelöstem $(\text{PhOx})_{20}\text{-BSA}$ erzielt. Das gelöste $(\text{PhOx})_2\text{-BSA}$, das nur einzelne Bindungsstellen eines PhOx-hFc-Moleküls binden konnte, führte erst ab Konzentrationen von $5 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ zu einer 50%igen Bindungshemmung des scPhOx-hFc-Proteins gegenüber dem oberflächengebundenen Antigen.

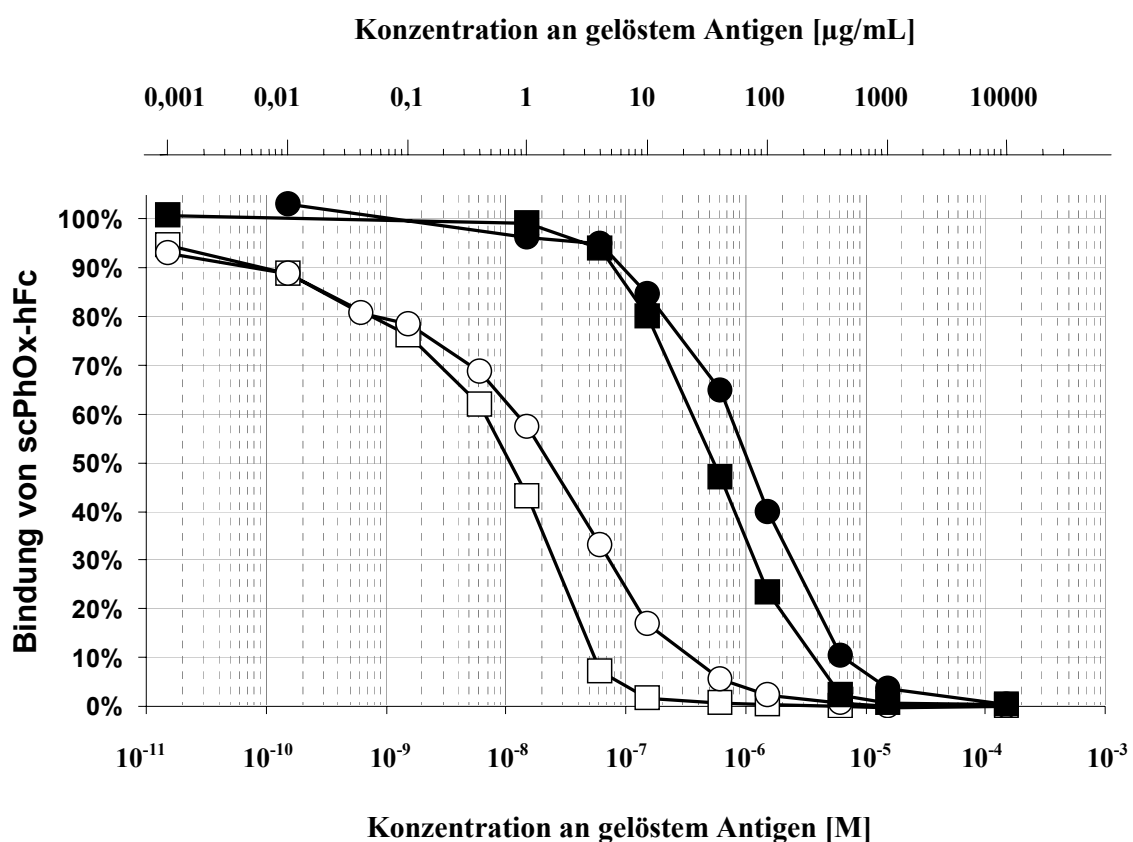


Abbildung 37 – Die Antigenbindung des scPhOx-hFc-Proteins wurde durch gelöstes Antigen mit multiplen PhOx-Gruppen bei erheblich geringeren Konzentrationen gehemmt als durch Antigen mit einzelnen PhOx-Gruppen.

Die ELISA-Platten wurden mit $(\text{PhOx})_2\text{-BSA}$ (Quadrate) oder $(\text{PhOx})_{20}\text{-BSA}$ (Kreise) beschichtet („Coating“). Die Antigenbindung des scPhOx-hFc-Proteins (= extrazellulärer Anteil des clgTCR-Konstruktes scPhOx-hFc ζ) wurde in Gegenwart von gelöstem $(\text{PhOx})_{20}\text{-BSA}$ (leer) und $(\text{PhOx})_2\text{-BSA}$ (gefüllt) gehemmt. Zur Berechnung der Molarität wurde für das Antigen unabhängig von der Zahl der PhOx-Gruppen ein Molekulargewicht von 65 kDa angenommen.

4.5 Studien mit γ -bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen

4.5.1 Wachstumsinhibition der YT-Zellen durch γ -Bestrahlung

Das unbegrenzte Wachstum der humanen NK-Zelllinie muß für eine klinische Anwendung beschränkt werden. Die γ -Bestrahlung stellt ein wirksames Mittel zur Wachstumsbegrenzung von Zellen dar und wurde in dieser Arbeit untersucht. Zunächst wurde die Abhängigkeit des Wachstums der Zelllinie YT nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen γ -Strahlung untersucht (Abbildung 38). Strahlungsdosen ab 2000 rad hemmten das Wachstum der YT-Zellen in allen Versuchen vollständig und irreversibel. Einen Tag nach Bestrahlung mit einer Dosis von mindestens 2000 rad waren noch 60 – 90% der YT-Zellen vital. Zwei Tage nach Bestrahlung nahm der Anteil an lebenden YT-Zellen weiter ab und sank auf 20 – 40% der Ausgangszellzahl. Nach insgesamt 6 – 8 Tagen wurde nur noch 1% der ursprünglich eingesetzten YT-Zellen nicht durch Trypanblau gefärbt. Zwei Wochen nach Bestrahlung mit mindestens 2000 rad ließen sich in der gesamten Zellkultur keine vitalen YT-Zellen mehr nachweisen.

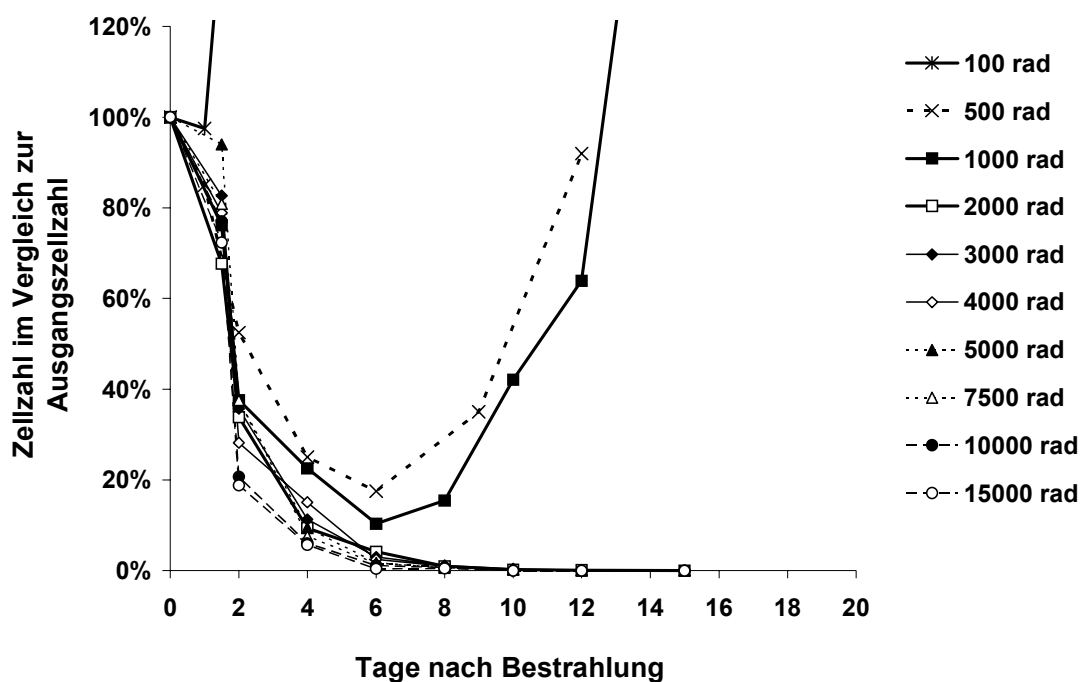


Abbildung 38 – Das Wachstum der YT-Zellen wurde nach γ -Bestrahlung mit 2000 rad vollständig und irreversibel gehemmt.

Die YT-Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen γ -Strahlung behandelt und anschließend in Kultur genommen. Die Zellzahl wurde mehrere Tage bestimmt und im Verhältnis zur Ausgangszellzahl aufgetragen. Die eingesetzten Strahlungsdosen sind in der Abbildung angegeben.

4.5.2 Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen nach γ -Bestrahlung

Die Zytotoxizität bestrahlter scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde gegenüber den CEA $^+$ MC32A-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis und für unterschiedliche Zeitpunkte nach der Bestrahlung untersucht, um den Einfluß der Bestrahlung auf die Effektor-eigenschaften der genmodifizierten YT-Zellen zu untersuchen. Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen nahm einen Tag nach γ -Bestrahlung nur bei Strahlungsdosen > 10000 rad geringfügig ab verglichen mit den unbestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen. Eine unspezifische Zytotoxizität der bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen konnte gegenüber den CEA $^-$ MC38-Zellen nicht beobachtet werden (Abbildung 39).

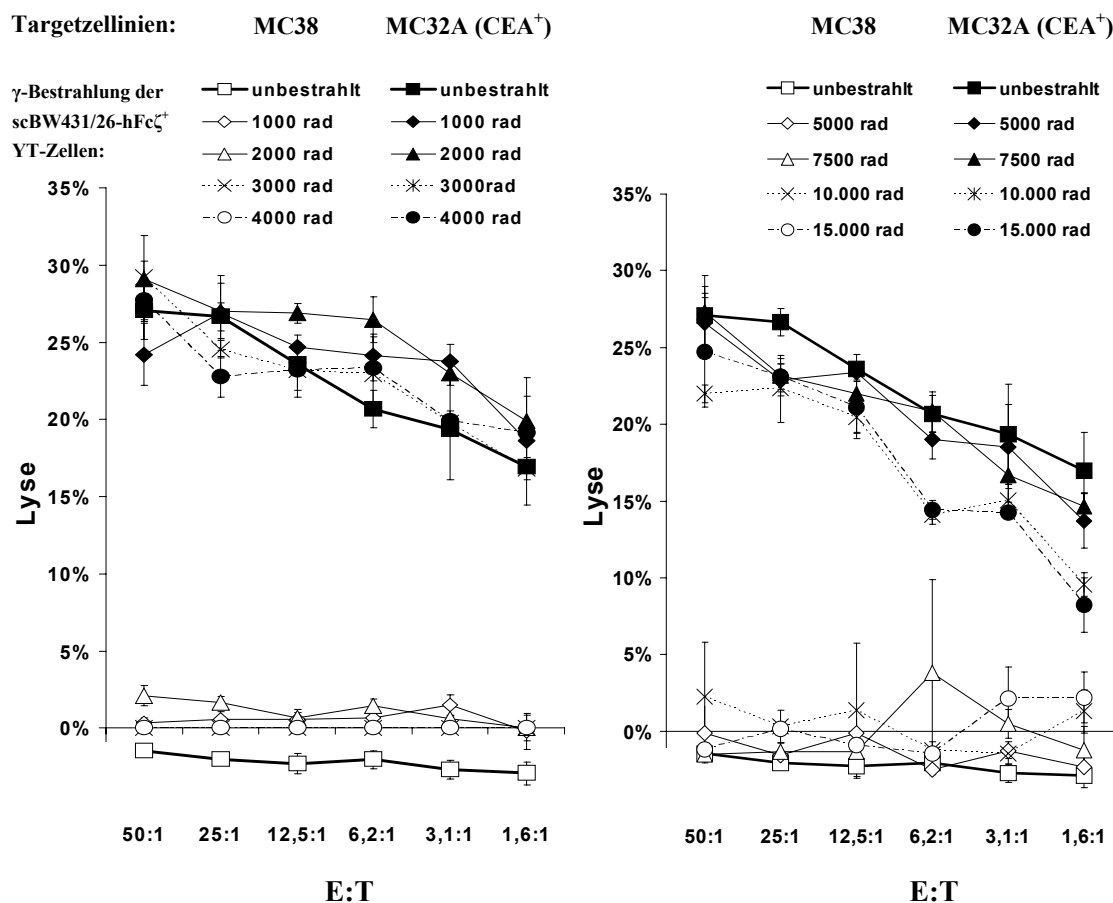


Abbildung 39 – Einen Tag nach γ -Bestrahlung der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen blieb deren CEA-spezifische Zytotoxizität erhalten.

Einen Tag nach γ -Bestrahlung wurde die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen gegenüber der CEA-transfizierten Zelllinie MC32A durch 4 h- ^{51}Cr -Freisetzungssassays untersucht. Um eine unspezifische Aktivierung durch die Bestrahlung auszuschließen, wurden auch die CEA $^-$ MC38-Zellen als Target untersucht. Die Strahlungsdosen und die Targetzelllinien sind in der Abbildung angegeben.

Durch γ -Bestrahlung kann die Expression von Genen beeinträchtigt werden. Einen Tag nach γ -Bestrahlung mit 1000 – 15000 rad konnte nur eine geringe Abnahme der Oberflächenexpression des cIgTCR-Konstruktes auf den scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen beobachtet werden (Abbildung 40).

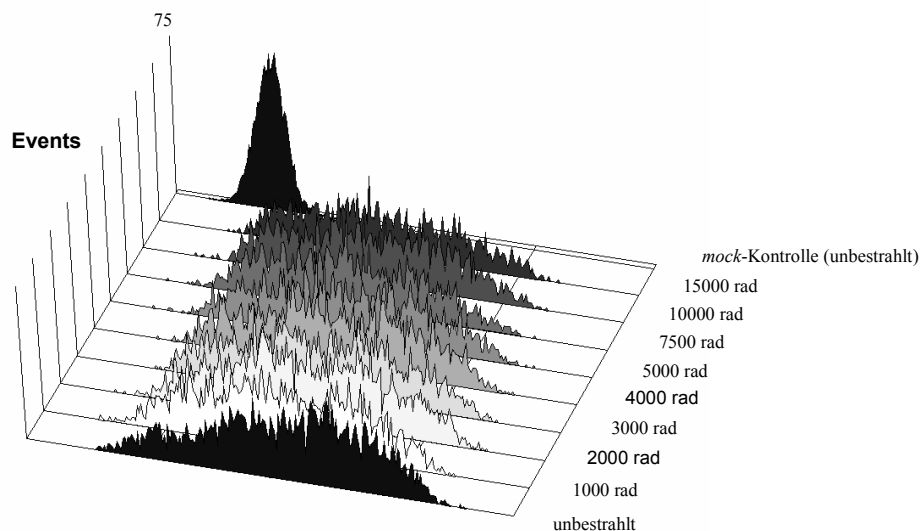


Abbildung 40 – Die Expression des cIgTCR-Konstruktes auf den scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen blieb einen Tag nach γ -Bestrahlung unverändert.

Die Expression des cIgTCR-Konstruktes auf den scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde einen Tag nach deren γ -Bestrahlung durch FACS-Analyse untersucht. Als Kontrollen sind die Färbungen von unbestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen und *mock*-transfizierten YT-Zellen dargestellt. Die Strahlungs Dosen für die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen sind in der Abbildung angegeben.

Drei Tage nach Bestrahlung reduzierte sich die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen gegenüber den CEA $^+$ MC32A-Zellen bei einer Strahlendosis von 1000 rad auf die Hälfte, bei 3000 rad auf ein Drittel und bei 5000 – 10000 rad auf ein Viertel verglichen mit der Zytotoxizität unbestrahlter scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen (Abbildung 41 a). Nach fünf Tagen lysierten nur die mit 1000 rad bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen noch 15% der CEA $^+$ MC32A-Zellen verglichen mit 42% Lyse, die durch die unbestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen vermittelt wurden (E : T = 25 : 1). Die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen, die mit 3000 – 10000 rad bestrahlt worden waren, zeigten dagegen keine signifikante Zytotoxizität gegenüber den CEA $^+$ MC32A-Zellen (Abbildung 41 b).

Bei diesen Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden nur vitale scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen verwendet, die über einen Lymphoprep $^{\text{TM}}$ -Dichtegradienten von den toten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen isoliert wurden. Wenn die zurückgehende Anzahl vitaler scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen berücksichtigt wird, ist die Zytotoxizität der scBW431/26-

hFc ζ^+ YT-Zellen gegenüber den CEA $^+$ MC32A-Tumorzellen 3 – 5 Tage nach lethaler Bestrahlung noch stärker vermindert.

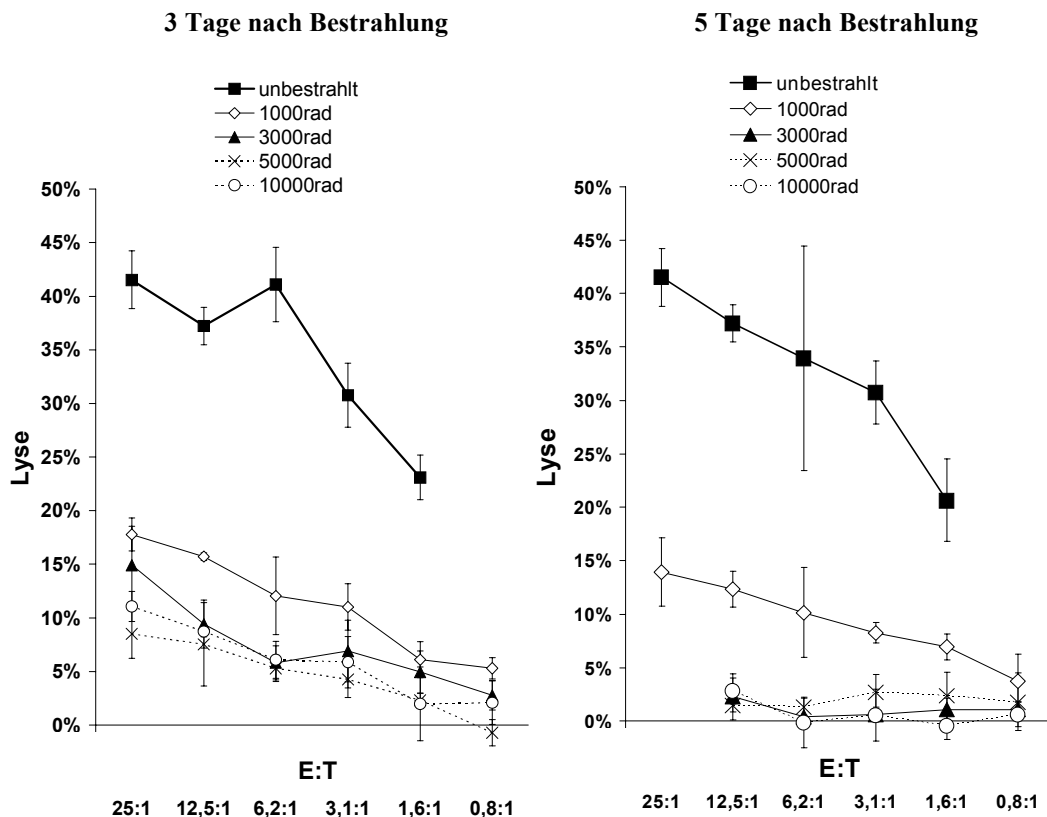


Abbildung 41 – Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen war schon drei Tage nach Bestrahlung gegenüber der CEA $^+$ Zelllinie MC32A deutlich reduziert.

Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde drei Tage (a) und fünf Tage (b) nach deren γ -Bestrahlung gegenüber der CEA $^+$ Zelllinie MC32A in 4 h- ^{51}Cr -Freisetzungsassays untersucht. Die Strahlungsdosen für die γ -Bestrahlung der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen sind angegeben.

4.6 Maustumormodell

4.6.1 Adoptiver Transfer bestrahlter scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen zur Behandlung minimaler CEA $^+$ MC32A-Tumore in NOD/SCID-Mäusen

Die Wirkung bestrahlter scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde in einem NOD/SCID-Mausmodell gegenüber CEA $^+$ MC32A-Tumoren untersucht. Die Bildung von MC32A-Tumoren in NOD/SCID-Mäusen wurde durch die gemeinsame subkutane Injektion von scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen, die mit einer Dosis von 5000 rad bestrahlt wurden, signifikant (Mann-Whitney U-Test, $p < 0,05$) im Vergleich zu den Kontrollgruppen gehemmt

(Abbildung 42). Den Kontrollgruppen wurden PBS oder bestrahlte scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen zusammen mit den MC32A-Tumorzellen subkutan injiziert. Für die Überlebensanalyse wurden Mäuse mit einem Tumervolumen $> 1 \text{ cm}^3$ als tot klassifiziert. Die 50%-Überlebensrate wurde durch die Koinjektion von MC32A-Tumorzellen mit den bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen 14 – 18 Tage später erreicht als in den Kontrollgruppen. Zwei von sechs Mäusen dieser Gruppe bildeten keinen Tumor aus ($< 0,001 \text{ cm}^3$). Nach Koinjektion von MC32A-Tumorzellen mit den bestrahlten scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen bildeten alle Mäuse MC32A-Tumore. In der PBS-Kontrollgruppe entwickelte eine von sechs Mäusen keinen MC32A-Tumor. In den weiteren Versuchen entwickelten sämtliche NOD/SCID-Mäuse MC32A-Tumore, wenn ihnen MC32A-Zellen allein subkutan injiziert wurden, so daß die überlebende Maus dieser PBS-Gruppe möglicherweise ein Artefakt ist (siehe Abschnitt 4.6.2).

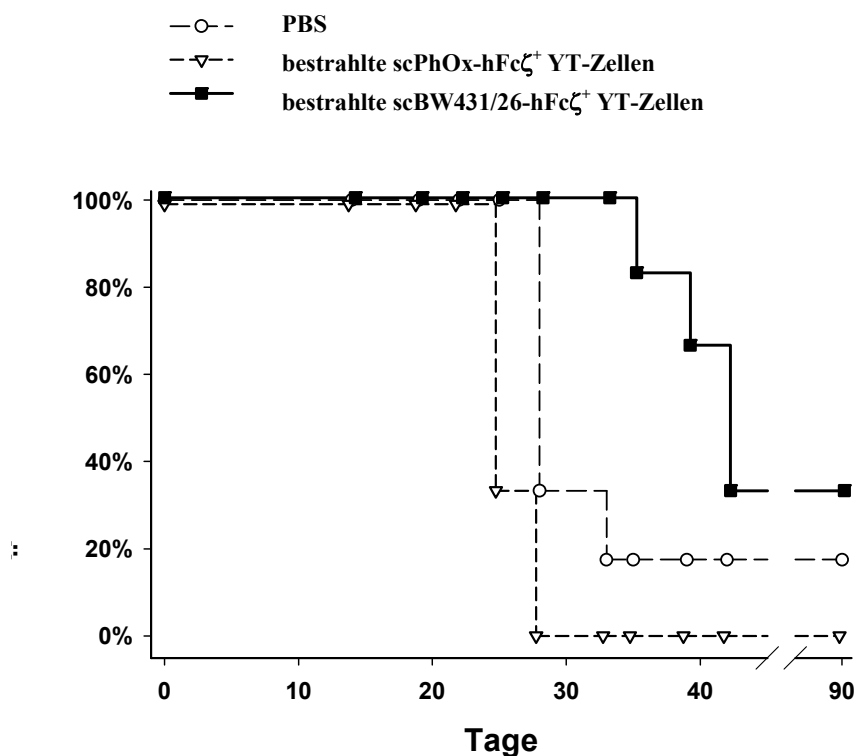


Abbildung 42 – Die Koinjektion von CEA $^+$ MC32A-Tumorzellen und bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen führte zur Hemmung des Tumorwachstums in NOD/SCID-Mäusen.

Am Tag 0 wurden sechs NOD/SCID-Mäusen je Gruppe 10^6 CEA $^+$ MC32A-Tumorzellen (Klon 6) zusammen mit 10^7 γ -bestrahlten CEA-spezifischen scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen, 10^7 γ -bestrahlten PhOx-spezifischen scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen oder PBS (siehe Legende) subkutan injiziert. Die kumulativen Überlebensraten wurden angegeben. Die Mäuse wurden getötet, wenn der MC32A-Tumor ein Volumen von 1 cm^3 überschritt und als tot klassifiziert.

4.6.2 Adoptiver Transfer bestrahlter scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen zur Bekämpfung etablierter CEA $^+$ MC32A-Tumore

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden 12 NOD/SCID-Mäusen CEA $^+$ MC32A-Tumorzellen subkutan implantiert. Sämtliche Mäuse entwickelten spätestens nach 19 Tagen palpable Tumore. Die zweimalige intratumorale Injektion von jeweils 10^7 bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen in sechs Mäuse am Tag 19 und 26 hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Wachstum der MC32A-Tumore verglichen mit der Kontrollgruppe, denen bestrahlte scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen injiziert wurden (Abbildung 43). Am Tag 19 hatten einige Mäuse schon recht große MC32A-Tumore ($0,20 \pm 0,13 \text{ cm}^3$) entwickelt, die ihr Tumolvolumen binnen weniger Tage verdoppelten. Bei Mäusen mit kleinen Tumoren konnte unmittelbar nach der intratumoralen Injektion der bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen eine geringfügige und zeitlich begrenzte Verlangsamung des Tumorwachstums beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

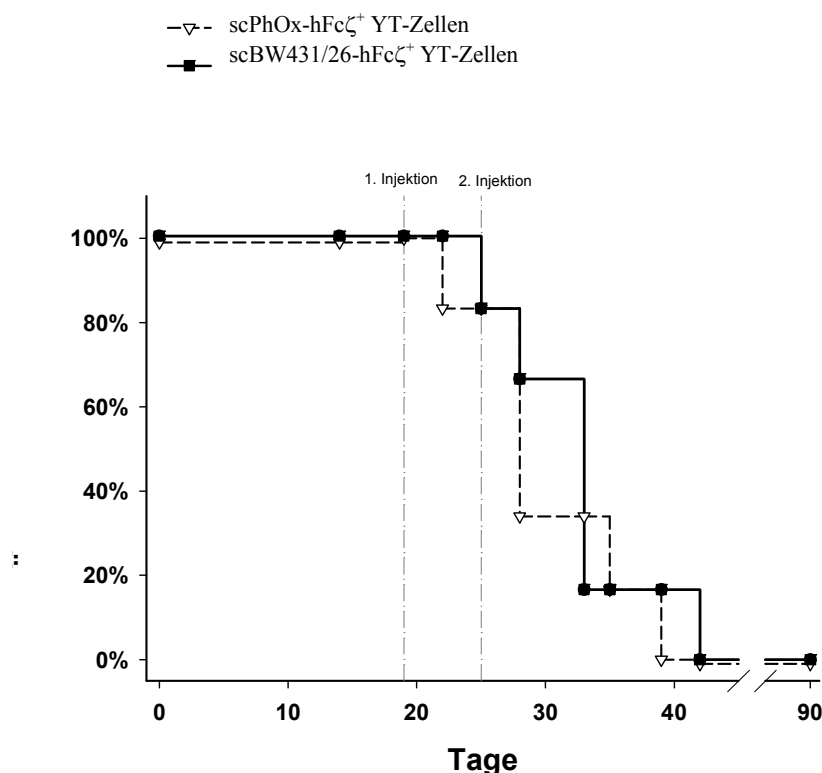


Abbildung 43 – Die intratumorale Injektion bestrahlter scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen hatte keinen signifikanten Effekt auf das Wachstum etablierter CEA $^+$ MC32A-Tumore in NOD/SCID-Mäusen.

Am Tag 0 wurden jeweils sechs NOD/SCID-Mäusen pro Gruppe 10^6 CEA $^+$ MC32A-Zellen subkutan injiziert. Am Tag 19 und 26 wurden je 10^7 γ -bestrahlte scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen intratumoral in die MC32A-Tumore injiziert. Der Kontrollgruppe wurden 10^7 γ -bestrahlte scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen intratumoral injiziert. Mäuse mit einem MC32A-Tumor $> 1 \text{ cm}^3$ Volumen wurden als tot klassifiziert.

4.7 Sensibilität der cIgTCR⁺ YT-Zellen gegenüber allogenen Lymphozyten

4.7.1 Abstoßung der cIgTCR⁺ YT-Zellen durch allogene PBL und NK-Zellen

Die Abstoßung einer allogenen Effektorzelllinie durch das Immunsystem des Empfängers könnte ihren Einsatz für eine adoptive Immuntherapie einschränken. Aus diesem Grund wurden einige *in-vitro*-Studien durchgeführt, um die Empfindlichkeit der cIgTCR⁺ YT-Zellen gegenüber allogenen humanen PBL und NK-Zellen (> 90% CD3⁺, CD56⁺, CD16⁺) zu testen.

YT-Zellen, die mit einem cIgTCR-Genkonstrukt transfiziert waren, wurden maximal 1 – 3% stärker durch allogene PBL lysiert als die *mock*-transfizierten YT-Zellen (Abbildung 44 a). Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn nur die aus den allogenen PBL isolierten NK-Zellen als Effektorzellen eingesetzt wurden (Abbildung 44 b). Eine höhere cIgTCR-Expression der transfizierten YT-Zellen schien eine geringfügig höhere Lyse durch die allogenen PBL und NK-Zellen zu bewirken. Die Zytotoxizität blieb jedoch in allen Versuchen unter 6% (E : T = 50 : 1). Die Ergebnisse konnten mit den PBL und NK-Zellen von unterschiedlichen allogenen Spendern bestätigt werden.

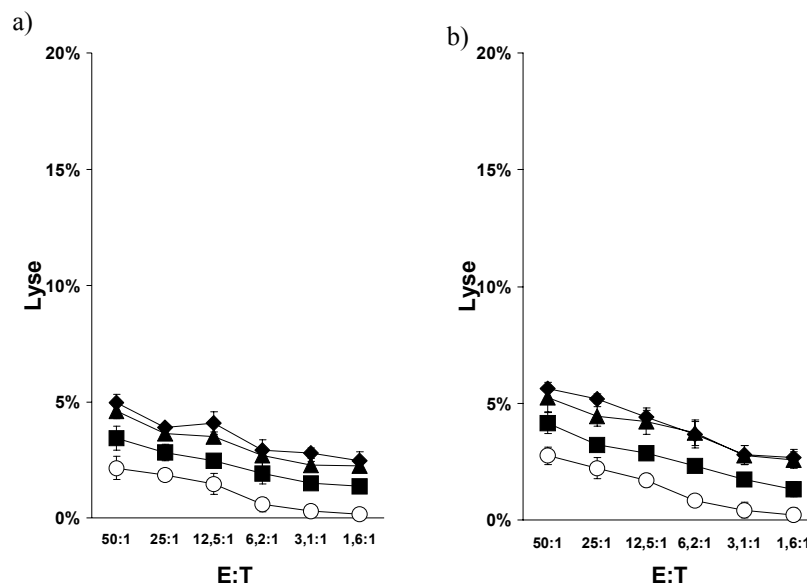


Abbildung 44 – Allo gene PBL und NK-Zellen zeigten nur eine geringe Zytotoxizität gegenüber den *mock*- oder cIgTCR-transfizierten YT-Zellen.

Die Zytotoxizität frisch isolierter humaner PBL (a) und NK-Zellen (b) eines allo genen Spenders wurden als Effektorzellen gegenüber scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen (◆), scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen (▲) scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen (■) und *mock*-transfizierten YT-Zellen (○) in 4 h-⁵¹Cr-Freisetzungssassays untersucht. Die Targetzellyse wurde mit den Standardabweichungen angegeben.

4.7.2 Stimulation allogener Lymphozyten durch die cIgTCR⁺ YT-Zellen

YT-Zellen exprimieren kostimulatorische Moleküle und MHC-Klasse-I/-II, die eine spezifische Aktivierung von T-Zellen auslösen könnten. Humane allogene PBL wurden deshalb mit bestrahlten *mock*- oder cIgTCR-transfizierten YT-Zellen eine Woche lang inkubiert, bevor sie im Zytotoxizitätsassay als Effektorzellen eingesetzt wurden. Es wurde keine Zunahme der Zytotoxizität der stimulierten PBL gegenüber *mock*- oder cIgTCR-transfizierten YT-Zellen beobachtet. Außerdem wurden keine Unterschiede in der Lyse *mock*-transfizierter YT-Zellen, scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen oder scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen durch die stimulierten PBL festgestellt unabhängig davon, ob *mock*-, scBW431/26-hFc ζ^- - oder scPhOx-hFc ζ^- -transfizierte YT-Zellen als Stimulatorzellen eingesetzt wurden (Abbildung 45).

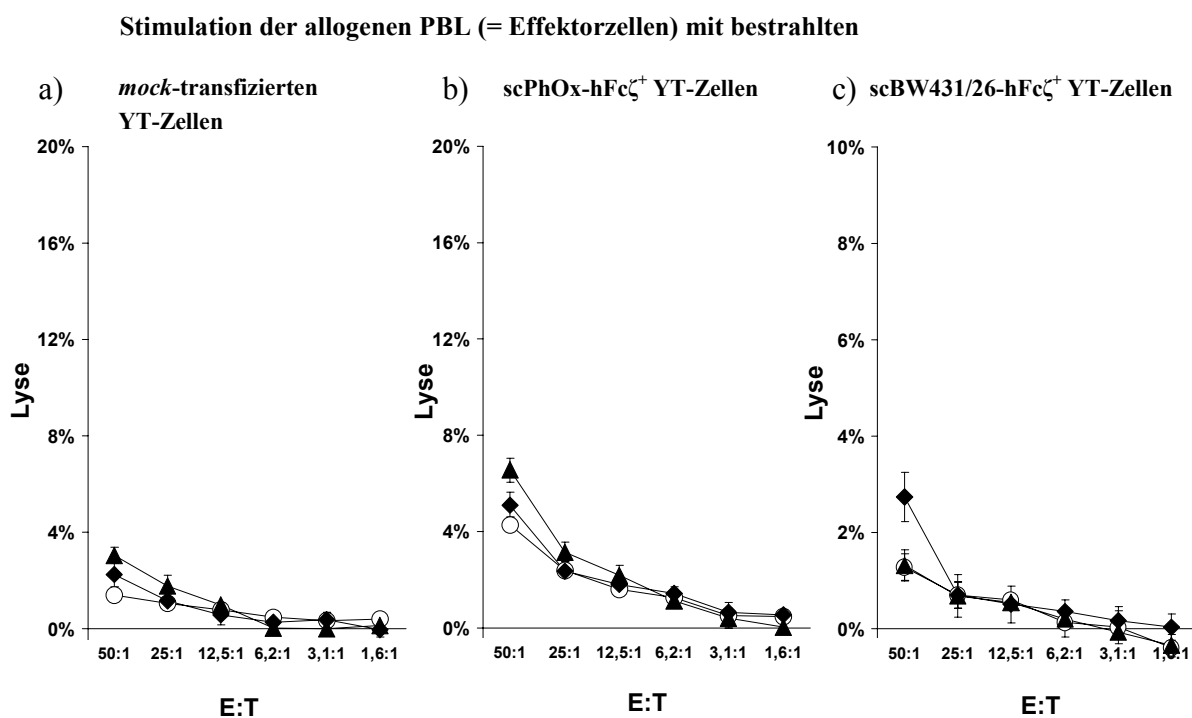


Abbildung 45 – Die Kokultivierung allogener PBL mit bestrahlten *mock*- oder cIgTCR-transfizierten YT-Zellen führte zu keiner Zunahme ihrer Zytotoxizität.

Allogene PBL wurden eine Woche mit bestrahlten *mock*-transfizierten YT-Zellen (a), scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen (b) oder scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen (c) stimuliert. Die stimulierten PBL wurden als Effektorzellen gegenüber *mock*-transfizierten YT-Zellen (○), scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen (◆) oder scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen (▲) in 4 h-⁵¹Cr-Freisetzungssays eingesetzt. Die Targetzellyse wurde mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben.

5 Diskussion

Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen weisen häufig einen Mangel an funktionellen tumorspezifischen Lymphozyten auf (Finke et al., 1999). Das Aussetzen der Immunabwehr könnte durch den adoptiven Transfer tumorspezifischer Lymphozyten kompensiert werden. Deshalb gilt die gezielte adoptive Immuntherapie als ein hoffnungsvoller Ansatz für die Behandlung von Tumorerkrankungen. Eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg dieser Strategie ist die Bereitstellung einer ausreichenden Menge an Lymphozyten mit hoher Tumorspezifität und potenten Effektoreigenschaften.

Adoptive Immuntherapien mit autologen LAK-Zellen oder TILs erzielten nur eine begrenzte klinische Wirkung bei wenigen Tumorarten (Bordignon et al., 1999). Die Erzeugung tumorspezifischer T-Zellen durch retroviralen Gentransfer (Engels et al., 2003; Farson et al., 1999; Finer et al., 1994; Uckert et al., 1998; Weijtens et al., 1998a) von rekombinanten TCR-Konstrukten (Calogero et al., 2000; Eshhar, 1997) könnte die Einschränkungen von LAK- und TIL-Therapien, wie mangelnde Spezifität oder komplizierte Isolation und Expansion der Effektorlymphozyten, überwinden. Trotzdem bleibt die individuelle Herstellung genmodifizierter T-Zellen für den einzelnen Patienten kompliziert, zeitaufwendig und kostenintensiv. Allogene Ansätze einer adoptiven Immuntherapie ermöglichen eine patientenunabhängige Herstellung tumorspezifischer Effektorlymphozyten, sind jedoch nur im Rahmen immunrestituierender Therapien, beispielsweise nach einer allogenen Stammzelltransplantation, einsetzbar. Außerdem verursachen allogene Spenderlymphozyten neben ihrer antileukämischen Wirkung (Horowitz et al., 1990; Jiang et al., 1991) eine gegen den Empfänger gerichtete Immunreaktion (GvHD), und Abstoßungsreaktionen beschränken den Einsatz allogener Lymphozyten auf MHC-kompatible Empfänger, so daß wieder nur individualisierte Therapieansätze möglich sind.

Tumorspezifische Effektorzelllinien besitzen verglichen mit primären Effektorlymphozyten einige Vorteile für die adoptive Immuntherapie. Effektorzelllinien können im Gegensatz zu primären Lymphozyten unbegrenzt expandiert werden. Ihre Herstellung ist patientenunabhängig, kann im großen Maßstab erfolgen und ermöglicht einen hohen Standardisierungsgrad sowie eine erhebliche Verringerung des technischen, zeitlichen und finanziellen Aufwandes. Außerdem sind die Einsatzmöglichkeiten allogener Effektorzelllinien nicht wie bei den primären Lymphozyten auf den einzelnen Patienten beschränkt. Im Rahmen präklinischer und klinischer Studien wurden die zytotoxischen Zelllinien TALL-104 und NK-92 in Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen eingesetzt (Tonn et al., 2001;

Visonneau et al., 2000). Diese Untersuchungen zeigen, daß die Verträglichkeit allogener Effektorzelllinien in unterschiedlichen Patienten gewährleistet werden kann. Die Anwendung allogener tumorspezifischer Effektorzelllinien zur gezielten adoptiven Immuntherapie könnte deshalb zukünftig sogar eine breitere klinische Anwendung im Sinne eines „zellbasierten Medikamentes“ zu lassen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch den Gentransfer tumorspezifischer Rezeptorgenkonstrukte die Spezifität der humanen NK-Zelllinie YT (Yodoi et al., 1985) auf CEA⁺ und CD33⁺ Tumorzellen erweitert werden kann. Die YT-Zelllinie ist eine unbegrenzt wachsende NK-Zelllinie. Sie zeichnet sich gegenüber anderen NK-Zelllinien darin aus, daß sie unabhängig von IL-2 wächst und trotzdem über potente zytotoxische Effektoreigenschaften verfügt. Außerdem lassen sich die YT-Zellen über Plasmidvektoren durch Elektroporation genetisch modifizieren, während andere NK-Zelllinien in den meisten Fällen einen retroviralen Gentransfer erfordern. Aus diesen Gründen erfüllt die NK-Zelllinie YT günstige Voraussetzungen für die Erzeugung einer genmodifizierten tumorspezifischen Effektorzelllinie zur adoptiven Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

5.1 Tumorspezifische chimäre Immunglobulin-T-Zellrezeptoren für ein Targeting der NK-Zelllinie YT

Rezeptoren für ein Tumortargeting der NK-Zelllinie YT

Das *Tumortargeting* der humanen NK-Zelllinie YT durch Rezeptorgentransfer stellt bestimmte Anforderungen an die einzusetzenden Rezeptoren. In einer früheren Studie mit den YT-Zellen wurde gezeigt, daß eine verbesserte Bindung an die Zielzellen ohne ein zytotoxisches Signal keine Lyse von neuen Tumorarten ermöglichte (Schirrmann und Pecher, 2001). Rezeptoren für ein effizientes *Tumortargeting* der YT-Zellen müssen deshalb neben der tumorspezifischen Bindungsdomäne eine Signalkette enthalten oder mit Signalmolekülen assoziieren, die die Zytotoxizität dieser NK-Zelllinie auslösen können. In dieser Arbeit wurden chimäre Rezeptorkonstrukte aus einer antikörperbasierten Bindungsdomäne und der CD3 ζ -Signalkette des humanen TCR-Komplexes hergestellt. Diese chimären Immunglobulin-T-Zellrezeptoren (cIgTCRs) oder „*T-Bodies*“ verbinden die Antigenbindungseigenschaften von Antikörpern mit den Signaleigenschaften des TCR-Komplexes. Die cIgTCRs wurden als einzelsträngige Genkonstrukte aus tumorspezifischen *single-chain*-Antikörperfragmenten, dem humanen IgG1-Fc-Teil und der humanen CD3 ζ -Signalkette realisiert.

single-chain-Antikörper-Fragmente als Rezeptorbindungsdomänen

Die Antigenbindungsdomäne von Antikörpern ist auf die variablen Regionen der leichten und schweren Immunglobulin-Ketten verteilt, deren Assemblierung erst durch B-zellspezifische Mechanismen effizient erfolgt (Foy und Matsuuchi, 2001; Knarr et al., 1995; Leitzgen et al., 1997; Vanhove et al., 2001). Um die Antikörperbindungseigenschaften in einem einzelsträngigen Rezeptorkonstrukt nutzen zu können, müssen die V-Regionen des Antikörpers über einen flexiblen und löslichen Peptid-*Linker* zu einem scFv-Fragment fusioniert werden (Bird et al., 1988). Da die Bindungseigenschaften bei der scFv-Konstruktion zerstört werden können (Asano et al., 2000), war eine Expression und Analyse der scFv-Fragmente erforderlich, bevor sie zur Konstruktion der cIgTCR-Konstrukte eingesetzt werden konnten.

Das scFv-Fragment scBW431/26 wurde aus den V-Regionen des CEA-spezifischen humanisierten Antikörpers BW431/26 konstruiert, indem die V_L-Region mit der V_H-Region über den *Linker*-218 (Whitlow et al., 1993) fusioniert wurde. Da die Anordnung der V-Regionen und der verwendete Peptid-*Linker* die Expressions- und Bindungseigenschaften der scFv-Fragmente beeinflussen können (Tsumoto et al., 1994), wurde zusätzlich das scFv-Fragment BW431/26-Yol konstruiert, bei dem die V_H-Region mit der V_L-Region über den *Yol-Linker* verknüpft war. Außerdem wurden zwei phOx-spezifische scFv-Fragmente mit diesen Konfigurationen bereitgestellt oder konstruiert, die als Kontrollen für die scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol dienen sollten.

Zur Überprüfung der Bindungseigenschaften wurden die scFv-Fragmente exprimiert. Die periplasmatische Expression gilt als erfolgreichste Methode, um einen hohen Anteil an funktionellen scFv-Fragmenten in *E. coli* zu produzieren (Kazemier et al., 1996; Pluckthun, 1991; Skerra und Pluckthun, 1988). Die Expression wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und bei 26 – 28°C durchgeführt. Durch die schwache Induktion des *lac*-Promoters und Temperaturen zwischen 25 – 30°C wird die Expression der scFv-Proteine verlangsamt, wodurch die Aggregation und Ablagerung in den „*inclusion bodies*“ vermindert und die Sekretion ins Periplasma gefördert werden (Breitling und Dübel, 1997). Die Zugabe von 0,4 M Saccharose während der Expressionsphase fördert die Anreicherung der scFv-Proteine im Periplasma und deren Freisetzung ins Medium und ermöglicht die Isolation der scFv-Fragmente aus dem Kulturüberstand (Kipriyanov et al., 1996; Kipriyanov et al., 1997a; Sawyer et al., 1994).

Die scFv-Fragmente scPhOx (V_L / *Linker*-218 / V_H) und PhOx-Yol (V_H / *Yol-Linker* / V_L) ließen sich mit diesem Expressionssystem in großen Mengen funktionell

exprimieren und aufreinigen. Im Gegensatz dazu konnten nur sehr geringe Mengen der scFv-Fragmente scBW431/26 (V_L / *Linker-218* / V_H) und BW431/26-Yol (V_H / *Yol-Linker* / V_L) periplasmatisch in *E. coli* exprimiert werden. Das aufgereinigte Protein dieser scFv-Fragmente zeigte keine spezifische Bindung gegenüber CEA. Als Ursache für die geringe Ausbeute und die fehlende Funktionalität der scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol konnte eine fehlerhafte Faltung und inkorrekte Ausbildung der Disulfidbrücken bei der bakteriellen Expression vermutet werden.

Die Ergebnisse ließen jedoch keinen eindeutigen Schluß zu, ob der Verlust der Bindungseigenschaften der scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol durch das Design der scFv-Konstrukte oder durch die bakterielle Expression verursacht wurde. Da die scFv-Fragmente scBW431/26 und BW431/26-Yol analog zu scPhOx und PhOx-Yol konfiguriert waren, scheint die funktionelle bakterielle Expression dieser scFv-Fragmente weniger durch die Anordnung der V-Regionen oder die verwendeten *Linker*-Sequenzen als durch die V-Regionen selbst beeinflusst worden zu sein. Für diese Erklärung spricht die Herkunft der V-Regionen dieser scFv-Fragmente. Das PhOx-Yol-Konstrukt wurde aus einem scFv-Fragment hergestellt, das aus einer humanen Phagendisplaybibliothek isoliert und durch „*chain shuffling*“ optimiert wurde (Marks et al., 1992). Mit diesem Prozeß ist eine Selektion und Optimierung gegenüber bakteriellen Expressionsbedingungen verbunden (Deng et al., 1994). Die V-Regionen des Antikörpers BW431/26 wurden dagegen durch Humanisierung eines Maus-Antikörpers hergestellt (Gussow und Seemann, 1991) und für die Konstruktion eines humanen Antikörpers eingesetzt, der in Myelomzelllinien exprimiert wurde (Bosslet et al., 1992; Bruynck et al., 1993). Dementsprechend waren die V-Regionen des Antikörpers BW431/26 nicht hinsichtlich einer bakteriellen Expression selektiert und optimiert.

Probleme und Optimierungen der bakteriellen scFv-Expression

Die Ausbeute korrekt gefalteter rekombinanter Antikörperfragmente gilt bei der bakteriellen Expression als nicht vorhersagbar und kann durch viele Faktoren beeinflusst werden (Breitling und Dübel, 1997). Die Optimierung von scFv-Konstrukten für die bakterielle Expression kann sehr aufwendig sein und ist in vielen Fällen nicht übertragbar (siehe 1.6.5). In einigen scFv-Fragmenten konnte durch den Austausch einzelner Aminosäuren die funktionelle Expression erheblich gesteigert werden (Kipriyanov et al., 1997b). Einige Modifizierungen des Expressionsvektors pOPE51 könnten jedoch zu einer allgemeinen Verbesserung der bakteriellen scFv-Expression beitragen. Die Beseitigung des ungepaarten Cys-Restes vor dem (His)₅-Tag im pOPE51-Plasmid führt zu einer erhöhten Expression und Ausbeute an funktionellem scFv-Protein (Schmiedl et al., 2000). Anstelle des *lac*-Promoters könnte ein

T7/*lac*-Promoter (Matthey et al., 1999) oder ein Tetrazyklin-Promoter (Griep et al., 1999) eine bessere Expressionskontrolle erlauben und die Beschränkung auf *E. coli*-Stämme mit *lacI^q*-Mutation aufheben.

Ein entscheidender Nachteil der *E. coli*-Expression ist die Bildung von scFv-Dimeren (Atwell et al., 1999; Hudson und Kortt, 1999; Wu et al., 1996) durch Aggregation der V-Regionen bei höheren Konzentrationen. Die Bildung von scFv-Dimeren kann falsch-positive Bindungseigenschaften monomerer scFv-Fragmente vortäuschen und sich problematisch auf die Herstellung von cIgTCR-Konstrukten auswirken.

scFv-hFc-Fusionsproteine als Alternative zu scFv-Fragmenten

Mit einem eukaryotischen Expressionssystem werden viele Probleme der bakteriellen Expression umgangen. Die scFv-Expression wurde für Insektenzellen (Choo et al., 2002; Kretzschmar et al., 1996), Pflanzenzellen (Tavladoraki et al., 1999) und Säugerzellen (Jost et al., 1994) beschrieben. In dieser Arbeit wurde die transformierte humane embryonale Nierenzelllinie 293T verwendet, da sie mittels Kalziumphosphattransfektion sehr effizient transfiziert werden kann. Die sekretorische Expression in einer humanen Zelllinie erfordert ein Signalpeptid, das die Translation des Transkripts in das endoplasmatische Retikulum lenkt. Die scFv-Konstrukte wurden deshalb am N-Terminus mit dem Signalpeptid der humanen IgGκ-Kette fusioniert (Persic et al., 1997). Dieses Signalpeptid (*Leader-A/-C*) ermöglicht gleichzeitig auch die Plasmamembranexpression von Typ-I-Transmembranproteinen wie den cIgTCR-Konstrukten.

Am C-Terminus wurden die scFv-Fragmente mit dem Fc-Teil (*hinge-CH₂-CH₃*-Domänen) des humanen IgG1 fusioniert (Kato et al., 1995), der die Dimerisierung der scFv-hFc-Fusionsproteine bewirkt. Der humane Fc-Teil wurde in den cIgTCR-Rezeptorkonstrukten als extrazelluläre Verbindungsdomäne zwischen dem scFv-Fragment und der Signalkette eingesetzt, so daß die Expression der scFv-hFc-Proteine die Analyse der Bindungseigenschaften des gesamten extrazellulären Anteils der auf ihnen basierenden cIgTCR-Konstrukte ermöglichte.

Die scFv-hFc-Fusionsproteine scBW431/26-hFc und scPhOx-hFc, die aus den scFv-Fragmenten scBW431/26 und scPhOx konstruiert wurden, konnten in den 293T-Zellen in großen Mengen sekretorisch exprimiert werden. Die scFv-hFc-Proteine zeigten eine spezifische Bindung an ihre Antigene im ELISA. Damit bestätigte sich der Verdacht, daß die Bindungseigenschaften des scFv-Fragments scBW431/26 durch die bakterielle Expression und nicht aufgrund des gewählten scFv-Designs verloren gegangen waren. Ausgehend von

diesen Ergebnissen wurde aus den V-Regionen des humanisierten CD33-spezifischen Antikörpers HuM195 direkt das scFv-hFc-Konstrukt erzeugt. Die Konstruktion des scHuM195-hFc-Proteins, seine sekretorische Expression in den 293T-Zellen und die Analyse seiner Bindungseigenschaften konnten in kurzer Zeit durchgeführt werden.

Die Konstruktion von scFv-hFc-Proteinen und deren Expression in der Zelllinie 293T hatte viele Vorteile gegenüber der bakteriellen Expression von scFv-Fragmenten. Die scFv-hFc-Proteine wurden unabhängig von ihren Antikörper-V-Regionen funktionell exprimiert. Die scFv-hFc-Proteine entsprachen außerdem dem gesamten extrazellulären Anteil der cIgTCR-Konstrukte und gaben deren Bindungseigenschaften genauer als die scFv-Fragmente wieder. Die scFv-hFc-Proteine waren zudem über Monate sehr stabil und konnten wie normale Antikörper zur Färbung von Tumorzellen eingesetzt werden.

Der humane Fc-Teil als extrazelluläre „Spacer“-Domäne der cIgTCR-Konstrukte

Der humane Fc-Teil der scFv-hFc-Proteine wurde in den cIgTCR-Konstrukten als extrazelluläre Verbindungsdomäne zwischen den scFv-Fragmenten und der Transmembrandomäne der Signalkette eingesetzt, wo er als Abstandshalter („*Spacer*“) für die Antigenbindungsdomäne zur Plasmamembran fungierte. Außerdem bewirkt der Fc-Teil eine stabile Dimerisierung der cIgTCR-Konstrukte (Hombach et al., 1999; Hombach et al., 1998b) und unterdrückt die Interaktion mit der endogenen ζ -Kette. cIgTCR-Konstrukte ohne Dimerisierungsdomäne sind dagegen oft mit der endogenen ζ -Kette assoziiert, was ihre Funktion jedoch nicht einzuschränken scheint. Trotzdem können ihre Bindungs- und Signaleigenschaften beeinflusst werden (Hombach et al., 2000a). Heterodimere aus scFv- γ -Rezeptor und endogener ζ -Kette führten zu einer verringerten Antigenantwort und einer Reduktion der endogenen ζ -Kette in CTL-Hybridomen (Annenkov et al., 1998).

Neben dem Fc-Teil wurden auch CD4-Domänen (D3/D4-Domänen), die CD8 α -hinge-Region (Moritz und Groner, 1995; Ren Heidenreich et al., 2000) oder CD28-Domänen (Eshhar et al., 2001) als „*Spacer*“-Domänen eingesetzt. Das Einfügen dieser extraplasmatischen Domänen stabilisierte bei einigen cIgTCR-Konstrukten die Oberflächenexpression (Patel et al., 1999) und ermöglichte erst eine effektive Antigenerkennung und T-Zellaktivierung (Fitzer Attas et al., 1998; Moritz und Groner, 1995). Allgemein profitieren cIgTCR-Konstrukte mit der CD3 ζ -Kette mehr von diesen „*Spacer*“-Domänen als cIgTCR-Konstrukte mit der γ -Kette (Patel et al., 1999).

CD3 ζ -Kette als Signalkette der cIgTCR-Konstrukte

In den cIgTCR-Konstrukten dieser Arbeit wurde die humane CD3 ζ -Kette als Signalkette eingesetzt. Sie lieferte die Transmembrandomäne und die zytoplasmatischen Signaldomänen. Die Transmembrandomäne der ζ -Kette verankert nicht nur die Rezeptoren in der Plasmamembran, sondern kann auch an der Assoziation mit anderen Signalkomponenten beteiligt sein. Trotzdem ist die Transmembrandomäne der ζ -Kette nicht essentiell für ihre Signaltransduktion (Romeo et al., 1992). Unterschiedliche Wirkungen der Transmembrandomänen von CD4 und CD8 in cIgTCR-Konstrukten wurden jedoch beschrieben (Fitzer Attas et al., 1998; McGuinness et al., 1999; Roberts et al., 1994; Tran et al., 1995).

Die Signaltransduktion der CD3 ζ -Kette wird über die zytoplasmatischen ITAM-Sequenzmotive vermittelt. Obwohl die ζ -Kette im Gegensatz zu den anderen Signalkomponenten des TCR-Komplexes drei ITAMs aufweist, scheint die hohe Zahl dieser aktivatorischen Sequenzmotive nicht allein maßgebend für eine effiziente Signaltransduktion zu sein (Nolan et al., 1999; Ren-Heidenreich et al., 2002; Romeo et al., 1992; van Oers et al., 1998). Der Phosphorylierungszustand der CD3 ζ -Kette hängt von der Differenzierung und dem Status der T-Zellen ab (Love et al., 2000; Love und Shores, 2000). Die einzelnen ITAMs werden durch unterschiedliche Signalmoleküle in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand der anderen ITAMs erkannt (Zenner et al., 1996). Die ζ -Kette fördert effizienter als die γ -Kette die Positivselektion und T-Zellreifung (Shores et al., 1997), während sie bei der Vermittlung der T-Zellentwicklung und -Funktion gleichwertig zu sein scheinen. Bei der Kontrolle von Tumoren weisen cIgTCR-transfizierte T-Zellen eine größere Kapazität auf, wenn die ζ -Kette anstelle der γ -Kette in den cIgTCR-Konstrukten verwendet wird (Haynes et al., 2001).

5.2 Antigenexpression auf den Tumorzellen

Anwendung der scFv-hFc-Fusionsproteine als „Mini“-Antikörper

Die scFv-hFc-Fusionsproteine entsprechen IgG1-Antikörpern, deren Fab'-Fragmente durch scFv-Fragmente ersetzt worden sind, und könnten im gesamten Spektrum der Antikörperapplikationen eingesetzt werden. Die Einsparung von CL- und CH₁-Domänen reduziert ihr Molekulargewicht um 50 kDa gegenüber IgG1-Antikörpern, woraus verbesserte Verteilungseigenschaften für diagnostische oder therapeutische Anwendungen resultieren können.

In dieser Arbeit wurden die scFv-hFc-Fusionsproteine scBW431/26-hFc und scHuM195-hFc für die FACS-Analyse von Tumorzelllinien eingesetzt, um sie auf die Expression der Antigene CEA und CD33 zu untersuchen. Mit den scFv-hFc-Proteinen scBW431/26-hFc und scHuM195-hFc wurden die exakten Antigenepitope nachgewiesen, die durch die cIgTCR-Konstrukte scBW431/26-hFc ζ und scHuM195-hFc ζ erkannt werden. Als Negativkontrolle wurde das phOx-spezifische scPhOx-hFc-Protein verwendet, das keine auf Zellen natürlich vorkommenden Strukturen erkennt. Mit dem scPhOx-hFc-Protein wurden nur Zellen gefärbt, deren Oberfläche mit dem Hapten PhOx künstlich markiert worden war. Das scHuM195-hFc-Protein färbte spezifisch CD33⁺ myeloische Leukämiezelllinien mit derselben Intensität wie der zum Vergleich eingesetzte Antikörper WM54, so daß sich die Spezifität des scHuM195-hFc-Proteins für CD33 durch die FACS-Analysen bestätigen ließ. Im Gegensatz dazu zeigte das scBW431/26-hFc-Protein eine mit dem zum Vergleich eingesetzten Antikörper CEJ065 unterschiedliche Färbung humaner Tumorzelllinien.

Erkennungseigenschaften des scBW431/26-hFc-Proteins

Das scBW431/26-hFc-Protein färbte die CEA-transgene Maus-Kolonkarzinomzelllinie MC32A mit vergleichbarer Intensität wie der Antikörper CEJ065. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die FACS-Analysen humaner Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien erheblich in ihrer Intensität und dem Anteil gefärbter Zellen in Abhängigkeit davon, ob das scBW431/26-hFc-Protein oder der Antikörper CEJ065 für die Färbung eingesetzt wurden. In diesen Versuchen zeigte das scBW431/26-hFc-Protein immer eine strengere Spezifität als der Antikörper CEJ065. Obwohl eine CEA-Expression für die Kolonkarzinomzelllinien HT29, SW403 und SW1417 beschrieben ist (Chen et al., 1995; Philben et al., 1986; Shawler et al., 2002), wurden sie nur durch den Antikörper CEJ065, aber nicht durch das scBW431/26-hFc-Protein, gefärbt. Für diese kontroversen Ergebnisse gibt es mehrere Erklärungen. Viele „CEA-spezifische“ Antikörper zeigen Kreuzreaktionen mit anderen Mitgliedern der CEACAM-Proteinfamilie aufgrund homologer Domänen (Murakami et al., 1995). Für den zum Vergleich eingesetzten Antikörper CEJ065 wurde vom Hersteller eine Kreuzreaktivität mit CD66c (NCA90) angegeben. Die exakte Spezifität CEA-spezifischer Antikörper ist deshalb kritisch für die Beurteilung anderer Publikationen.

Für den Ursprungsantikörper des scBW431/26-hFc-Proteins, den Antikörper BW431/26, wurde mehrfach eine Spezifität für membrangebundenes CEA beschrieben (Bosslet et al., 1992; Bosslet et al., 1988; Hombach et al., 1999), ohne jedoch sein Antigenepitop eindeutig definieren zu können. Eine Involvierung von Kohlenhydratstrukturen wurde jedoch ausgeschlossen (Bosslet et al., 1985). Ein besonderes Epitop der CEA-Membranform

gegenüber gelöstem CEA ist nur schwer vorstellbar, da CEA über einen GPI-Anker mit Phospholipiden der Zellmembran verbunden ist.

Für CEA wurde die Bildung homodimerer Komplexe auf der Plasmamembran durch Interaktion seiner N-terminalen IgV-ähnlichen Domäne beschrieben. Weiterhin wird vermutet, daß CEA mit anderen Mitgliedern der CEACAM-Familie über diese N-Domäne heterodimere Komplexe bildet (Hammarstrom, 1999). Die Bildung heterodimerer Komplexe könnte durch Kompetition die Bildung von homodimeren CEA-Komplexen auf der Zelloberfläche unterdrücken. Wenn das scBW431/26-hFc-Protein erst durch Nutzung beider Antigenbindungsstellen eine stabile Bindung mit CEA eingeht, würde es spezifisch an homodimere CEA-Komplexe, aber nicht an heterodimere CEA-Komplexe, binden. Entscheidend für diese Hypothese sind eine geringe Affinität und eine hohe Avidität des scBW431/26-hFc-Proteins gegenüber CEA. Bei einer hohen Affinität würden homodimere und heterodimere CEA-Komplexe fest gebunden und bei einer Immunfärbung nicht unterschieden. Die zur Literatur widersprüchlichen FACS-Ergebnisse der CEA-Expression auf den humanen Kolonkarzinomzelllinien könnten deshalb mit der Expression unterschiedlicher CEA-Komplexe erklärt werden. Hochaffine CEA-spezifische Antikörper erkennen gleichermaßen alle Arten von CEA-Komplexen auf der Oberfläche von Tumorzellen, während das scBW431/26-hFc-Protein und sein Ursprungsantikörper BW431/26 nur an Tumorzellen mit homodimeren CEA-Komplexen binden.

Die vergleichbaren FACS-Analysen der CEA-transfizierten Maus-Kolonkarzinomzelllinie MC32A nach Färbung mit dem scBW431/26-hFc-Protein und dem Antikörper CEJ065 widersprechen dieser Hypothese nicht. Da es kein CEA-Pendant in der Maus gibt und die Maus-CEACAMs Unterschiede in ihren N-Domänen zu den humanen CEACAMs aufweisen, sollte das humane CEA auf den CEA-transfizierten MC32A-Zellen nur homodimere Komplexe bilden, die von dem scBW431/26-hFc-Protein und dem Antikörper CEJ065 erkannt werden. Die Bindung des scBW431/26-Proteins an das CEA-Protein im ELISA ist dadurch erklärbar, daß sich die N-Domänen von CEA bei erhöhten Konzentrationen homotypisch zusammenlagern (Krop-Watorek et al., 1998). Bei der Adsorption an der Plastikoberfläche sollten sich dementsprechend CEA-Aggregate ausbilden, die von dem scBW431/26-hFc-Protein und seinem Ursprungsantikörper BW431/26 erkannt werden.

5.3 Genetische Modifikation der humanen NK-Zelllinie YT

Gentransfer der cIgTCR-Konstrukte in die YT-Zelllinie

Der Gentransfer der tumorspezifischen cIgTCR-Konstrukte scBW431/26-hFc ζ und scHuM195-hFc ζ sowie des phOx-spezifischen Kontrollkonstruktes scPhOx-hFc ζ erfolgte mittels Elektroporation in die NK-Zelllinie YT. Obwohl nur geringe transiente Transfektionsraten von 1 – 2% erzielt wurden, konnten in allen Versuchen cIgTCR⁺ YT-Zellen mit G418 selektiert werden. Durch die Selektion stieg der Anteil cIgTCR-exprimierender YT-Zellen auf maximal 10% an. Im Gegensatz zu Hefen (Hinnen et al., 1978) können die Zellen höherer Organismen nur einen geringen Anteil der transfizierten Plasmide stabil in ihr Genom integrieren. Die chromosomale Integration von Plasmid-DNA beruht auf „illegitimen“ Rekombinationsmechanismen und führt nicht zwangsläufig zum gemeinsamen Einbau von Transgen und Selektionsmarker, der für die antibiotische Selektion transgener Zellen notwendig ist. Die Linearisierung der Plasmid-DNA kann die gemeinsame chromosomale Integration von Transgen und Selektionsmarker fördern, führte jedoch in dieser Arbeit zu keiner Verbesserung des stabilen Gentransfers.

Der Integrationsort, die Methylierung und die Chromatinzugänglichkeit des Transgens üben einen großen Einfluß auf die Höhe und Stabilität seiner Expression aus (Feng et al., 2001; Garrick et al., 1996; Schubeler et al., 2000). Außerdem kann die genomische Insertion von Fremd-DNA wichtige zelluläre Gene beeinflussen oder zerstören. Die Wahrscheinlichkeit für eine chromosomale Integration von Plasmid-DNA und deren Lokalisation kann durch flankierende homologe Genomsequenzen von mehreren tausend bp (Li und Baker, 2000) oder durch bestimmte virale Sequenzen, z. B. aus dem adenoassoziierten Virus (AAV), erhöht werden (Koduri et al., 2001; Kogure et al., 2001).

Eine stabile Transfektion wird auch mit episomal replizierenden Plasmiden erreicht. Diese autonom replizierenden Plasmide erzeugen mehrere Kopien, die während der Zellteilung zufällig auf die Tochterzellen verteilt werden. EBV-abgeleitete episomal replizierenden Plasmidvektoren, die den viralen Origin *ori p* und den an ihn bindenden Replikationsfaktor EBNA-1 (*EBV nuclear antigen-1*) enthielten (Mucke et al., 1997), wurden erfolgreich zum Gentransfer in die YT-Zelllinie verwendet (Schirrmann und Pecher, 2001). Der Nachteil dieser Vektoren besteht in der Expression eines viralen Antigens und der geringeren Stabilität der Transgenexpression.

Einige NK-Zelllinien wurden retroviral transfiziert (Nagashima et al., 1998; Tran et al., 1995). Retrovirale Vektoren ermöglichen einen stabilen Gentransfer, da sie ihr Erbgut in das

Genom der infizierten Zellen integrieren. Trotzdem ist die Herstellung von Retroviren für den Gentransfer mit einem höheren Aufwand verbunden.

Immunologische Anreicherung der cIgTCR⁺ YT-Zellen

Die cIgTCR⁺ YT-Zellen wurden effektiv durch immunologische Zellseparation mit einem Antikörper, der spezifisch für den humanen Fc-„Spacer“ der cIgTCR-Konstrukte ist, angereichert. Das MACS[®]-System (Miltenyi et al., 1990) zeichnete sich gegenüber der durchflußzytometrischen Strategie durch die schnelle Trennung großer Zellzahlen und den geringeren Streß für die Zellen aus. Bei der immunologischen Anreicherung ist eine zu starke Vernetzung der cIgTCR⁺ YT-Zellen, z. B. durch Verwendung eines Biotin/Streptavidin-Systems, zu vermeiden, da daraus wahrscheinlich eine gegenseitige Lyse der angereicherten cIgTCR⁺ YT-Zellen resultiert.

Immunologische Anreicherungsverfahren wurden auch für cIgTCR-transfizierte T-Zellen beschrieben (Beecham et al., 2000; Hombach et al., 2001c; Nolan et al., 1999; Weijtens et al., 1998a). Die durch Antikörper bedingte Kreuzvernetzung („cross linking“) der cIgTCR-Moleküle bei diesen Verfahren kann zur unspezifischen Aktivierung der transfizierten T-Zellen führen, die nicht nur zur Sekretion bestimmter Zytokine (Daly et al., 2000; Eshhar et al., 1993; Hombach et al., 1999; Hombach et al., 2001b; Hombach et al., 2000b; Moritz et al., 1994; Stancovski et al., 1993), sondern auch zum aktivierungsbedingten Zelltod (AICD, *activation induced cell death*), führen könnte. T-Zellen unterliegen dem AICD, wenn die Stimulation von TCR oder CD3 bei fehlender CD28-Kostimulation erfolgt (Li et al., 2000). NK-Zellen, die mit IL-2 oder IL-12 stimuliert wurden, unterliegen ebenfalls dem AICD, ausgelöst durch CD16-„crosslinking“ (Jewett, 2001; Ortaldo et al., 1995).

Die Notwendigkeit einer CD28-Kostimulation ist bei cIgTCR-transfizierten T-Zellen umstritten (Hombach et al., 2001c; Ren-Heidenreich et al., 2002). In cIgTCR-Konstrukten, die zusätzlich zur ζ -Kette mit CD28-Domänen ausgestattet wurden, konnte eine Kopplung von zytotoxischen und kostimulatorischen Signalen realisiert werden (Eshhar et al., 2001; Haynes et al., 2002a; Haynes et al., 2002b). Derartige cIgTCR-Konstrukte könnten auch das Effektorpotential der YT-Zellen erhöhen, da YT-Zellen über CD28 in der Lage sind, CD80⁺ Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren (Azuma et al., 1992; Montel et al., 1995b; Teng et al., 1996).

Expression der cIgTCR-Konstrukte auf den transfizierten YT-Zellen

Nach zweifacher Anreicherung exprimierten über 90% der cIgTCR-transfizierten YT-Zellen das Rezeptorkonstrukt auf ihrer Oberfläche. Die cIgTCR-Expression nahm nach einigen

Wochen Zellkultur geringfügig ab. Dieser Rückgang der cIgTCR-Expression könnte auf einen Wachstumsvorteil der YT-Zellen zurückgehen, die nur den Selektionsmarker *neo* in ihr Genom integriert hatten. Außerdem werden cDNA-basierte Transgene häufig herunterreguliert oder inaktiviert. Durch Verwendung genomischer Sequenzen anstelle reiner cDNA-Sequenzen könnte eine Stabilisierung und Erhöhung der Expression des Transgens erreicht werden (McKnight et al., 1995). Alternativ kann durch das Einfügen von Intronsequenzen in ein Transgen dessen Expression stabilisiert werden (Yew et al., 1997).

5.4 Zytotoxizität der genmodifizierten cIgTCR⁺ YT-Zellen

Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen gegenüber CEA⁺ Tumorzelllinien

Ein wichtiges Kriterium für ein erfolgreiches *Tumortargeting* der cIgTCR-transfizierten YT-Zellen ist der Nachweis der spezifischen Lyse von Tumorzellen. Die scBW431/26-hFcζ⁻-transfizierten YT-Zellen lysierten 50% der CEA-transgenen MC32A-Zellen. Die Lyse war auch bei kleinen E : T-Verhältnissen sehr effizient. Die CEA⁻ Ursprungszelllinie der MC32A-Zellen, die Zelllinie MC38, wurde dagegen durch die scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen nicht lysiert. Die CEA-spezifische Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen konnte nur auf den Gentransfer des cIgTCR-Konstrukts zurückgeführt werden, da die *mock*-transfizierten YT-Zellen, die pHox-spezifischen scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen und die CD33-spezifischen scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen keine Zytotoxizität gegenüber den CEA⁺ MC32A-Zellen vermittelten.

Die scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen erzielten gegenüber den humanen Kolonkarzinomzelllinien eine geringere Zytotoxizität als gegenüber den CEA-transgenen MC32A-Zellen. Eine Lyse von 10 – 15% gegenüber den humanen Kolonkarzinomzelllinien LoVo, LS174T, SW948 und SW1222 durch die scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen war für ein „*Tumortargeting*“ unspektakulär. Trotzdem korrelierte die Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen in allen Versuchen mit den FACS-Analysen, in denen die Tumorzelllinien mit dem scBW431/26-hFc-Protein gefärbt wurden. Die Immunfärbungen mit dem Antikörper CEJ065 zeigten dagegen keine Korrelation zur Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen. Deshalb lassen nur Immunfärbungen mit dem scBW431/26-hFc-Protein Aussagen über die potentielle Wirkung der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen zu. Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen könnte gegenüber klinischen Tumoren größer sein, weil der Ursprungsantikörper BW431/26 erfolgreich zur Färbung von Tumorbiopsien (Batge et al., 1986) und zur *in-situ*-Radiodiagnostik zum Nachweis von Kolorektalkarzinomen und anderen CEA⁺ Adeno-

karzinomen eingesetzt wurde (Baum et al., 1989a; Baum et al., 1989b; Boeckmann et al., 1990; Hertel et al., 1990). Weitere Untersuchungen müssen noch zeigen, ob klinische CEA⁺ Tumore effizienter durch die scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen erkannt und lysiert werden.

Hombach *et al.* (Hombach et al., 1999; Hombach et al., 2000b) ermittelten nach dem retroviralen Gentransfer von T-Zellen mit einem CEA-spezifischen cIgTCR-Konstrukt eine mit dieser Arbeit vergleichbare Zunahme der Zytotoxizität gegenüber den Kolonkarzinomzelllinien LoVo und LS174T. Bei diesen Studien zeigten die *mock*-transfizierten T-Zellen eine hohe unspezifische Hintergrundlyse, die durch die Aktivierung der T-Zellen mit IL-2 verursacht wird (Beecham et al., 2000; Eshhar et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde keine unspezifische Zytotoxizität durch den cIgTCR-Gentransfer in die YT-Zellen festgestellt, da *mock*- und scPhOx-hFc ζ -transfizierte YT-Zellen in den parallel durchgeführten Ansätzen keine Lyse gegenüber den untersuchten Kolonkarzinomzelllinien vermittelten.

Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ ⁺ YT-Zellen gegenüber phOx-markierten Zellen

Die als Effektorzellkontrollen eingesetzten scPhOx-hFc ζ ⁺ YT-Zellen wurden ebenfalls auf die Funktionalität ihres cIgTCR-Konstruktes untersucht. Dafür wurden Tumorzellen mit dem Hapten PhOx chemisch markiert. Die scPhOx-hFc ζ ⁺ YT-Zellen lysierten spezifisch nur die PhOx-gelabelten Zielzellen. T-Zellen wurden erfolgreich mit cIgTCR-Konstrukten spezifisch für das Hapten 2,4,6-Trinitrophenol (TNP) gegen TNP-markierte Zelllinien abgerichtet (Eshhar et al., 2001; Eshhar et al., 1993; Gorman et al., 1990). Durch eine gezielte Markierung von Tumorzellen mit Haptenen wäre ein therapeutischer Einsatz hapten-spezifischer Effektorzellen denkbar. Neben künstlichen Haptenen gibt es auch biologische Haptene, wie protein- und lipidassoziierte Kohlenhydrate. Yun *et al.* (Yun et al., 2000) transfizierten T-Zellen mit einem cIgTCR-Konstrukt spezifisch für das Gangliosid GD3 und erreichten die spezifische Lyse von GD3⁺ Melanomen.

Einfluß von freiem CEA auf die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen

Die Antikörperbindungsstellen können durch gelöstes Antigen blockiert werden. Dieses Problem wurde auch für cIgTCR-Konstrukte beschrieben (Daly et al., 2000; Eshhar et al., 1993; Gorman et al., 1990) und hat eine besondere Bedeutung, wenn Tumorantigene erkannt werden, die im Serum zirkulieren. Patienten mit Kolorektalkarzinomen weisen häufig CEA-Serumspiegel von 1 µg/mL (= 5,5 nM) auf (Moertel et al., 1986). Höhere Konzentrationen müssen am Ort des Tumors angenommen werden.

Die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen wurde in Gegenwart von bis zu 10 µg/mL (= 55 nM) an freiem CEA nicht gehemmt. In dieser Arbeit wurden keine höheren

CEA-Konzentrationen getestet. Hombach *et al.* (Hombach et al., 1999) ermittelten bei Konzentrationen von 25 µg/mL (= 140 nM) an gelöstem CEA im Medium keine Hemmung der antigenspezifischen Aktivierung der Maus-CTL-Linie MD45, die mit einem CEA-spezifischen cIgTCR-Konstrukt transfiziert war. Die Zytotoxizität von T-Zellen, die mit einem GD3-spezifischen cIgTCR-Konstrukt transfiziert waren, wurde sogar durch 100 µg/mL gelöstes GD3-Gangliosid nicht gegenüber GD3⁺ Melanomzellen gehemmt (Yun et al., 2000).

Konkurrenz des gelösten CEA-Proteins mit den cIgTCR-Antigen-Bindungen zwischen Effektor- und Zielzellen

Eine Ursache, warum die Zytotoxizität der scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen durch das gelöste CEA-Protein nicht gehemmt wurde, besteht darin, daß das gelöste Antigen mit vielen cIgTCR-Antigen-Bindungen zwischen den Effektor- und Zielzellen konkurrieren muß. Das zytotoxische Signal wird auch dann noch ausgelöst, wenn ein Teil der cIgTCR-Antigen-Interaktionen durch das freie Antigen blockiert wurde. Eine derartige Signalschwelle zeigt sich auch bei den scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen, da deren Zytotoxizität von der Intensität der CEA-Expression auf den verschiedenen MC32A-Klonen abhing.

Beecham *et al.* (Beecham et al., 2000) haben diese Fragestellung ausführlich diskutiert. Sie wiesen für T-Zellen, die mit einem CEA-spezifischen cIgTCR-Genkonstrukt transfiziert waren, ebenfalls keine Inhibition der Zytotoxizität in Gegenwart von 10 µg/mL an gelöstem CEA nach. Das scFv-Fragment dieses cIgTCR-Konstruktes wurde eingehend als Immuntoxin getestet (Akamatsu et al., 1998). Mittels *Scatchard-Plot*-Analyse wurden 5×10^4 – 5×10^5 CEA-Moleküle auf der Oberfläche von Tumorzellen mit einer mittleren bis hohen CEA-Expression ermittelt. Die Autoren schätzten daraus (wahrscheinlich unter Annahme von $1000 \mu\text{m}^2$ Oberfläche je Zelle \times $0,1 \mu\text{m}$ näherer Umgebung = $10^{-7} \mu\text{L}$) eine CEA-Konzentration von 1 – 10 µM an der Oberfläche der Tumorzellen ab, die erheblich über den im nanomolaren Bereich liegenden CEA-Serumkonzentrationen liegt. Eine 50%ige Inhibition des Immunotoxins gegenüber CEA⁺ Tumorzellen wurde durch 4 µg/mL (= 20 nM) gelöstes CEA erzielt und entspricht der Dissoziationskonstante des scFv-Fragments ($K_D = 21 \text{ nM}$). Demnach blockieren 10 µg/mL (= 55 nM) an gelöstem CEA, das entspricht dem 2,5-fachen K_D -Wert des scFv-Fragments, etwa 80% der cIgTCR-Bindungsstellen auf den cIgTCR⁺ T-Zellen, ohne jedoch deren Zytotoxizität zu hemmen.

Trotzdem können sich physiologisch relevante Konzentrationen an zirkulierendem Antigen hemmend auf die Zytotoxizität der cIgTCR-transfizierten Effektorzellen auswirken, wenn nur wenige Antigenbindungen mit den Zielzellen möglich sind. Weijtens *et al.* (Weijtens et al., 2000) zeigten, daß transfizierte T-Zellen mit einer hohen cIgTCR-Expression

auch gegenüber Zielzellen mit geringer Antigenexpression eine Lyse vermitteln, während bei geringer cIgTCR-Expression nur Tumorzellen mit hoher Antigenexpression lysiert werden. Deshalb ist bei einer geringen cIgTCR-Expression auf den Effektorzellen oder einer geringen Antigenexpression auf den Zielzellen, ein stärkerer Einfluß von freiem Antigen zu erwarten. Eine hohe cIgTCR-Expression auf den genmodifizierten Effektorzellen kann durch den Herstellungsprozeß erreicht werden. Einige Tumorantigene werden durch bestimmte Zytokine heraufreguliert. IFN- γ verstärkt die CEA-Expression auf einigen Tumorzelllinien (Yan et al., 1992). Ob die IFN- γ -Sekretion der YT-Zellen diesen Effekt auf die verwendeten Kolonkarzinomzelllinien ausübt, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Einfluß von Affinität und Avidität des scBW431/26-hFc ζ -Rezeptors auf die Hemmung durch zirkulierendes CEA

Neben der Zahl der cIgTCR-Antigen-Bindungen zwischen Effektor- und Zielzellen können weitere Faktoren die Inhibition durch freies Antigen verhindern. Bei der Analyse der Tumorzelllinien wurde bereits angenommen, daß das scBW431/26-hFc-Protein spezifisch an homodimere CEA-Komplexe bindet. Bei physiologischen Konzentrationen bildet gelöstes CEA keine Dimere und sollte deshalb nur schwach an das scBW431/26-hFc-Protein binden. Für den Ursprungsantikörper BW431/26 wurde ebenfalls die Irrelevanz von zirkulierendem CEA im Serum von Patienten beschrieben. Ein 20-facher molarer Überschuß an gelöstem CEA konnte seine Antigenbindung im ELISA nicht blockieren (Bosslet et al., 1988). Bei den meisten CEA-spezifischen Antikörpern wurde dagegen eine Hemmung bei geringeren CEA-Konzentrationen festgestellt (Murakami et al., 1996).

Aufgrund vergleichbarer Bindungseigenschaften des scBW431/26-hFc-Proteins und des cIgTCR-Konstruktes scBW431/26-hFc ζ sollten die gelösten CEA-Monomere nur schwach an die scBW431/26-hFc ζ -Rezeptoren auf den genmodifizierten YT-Zellen binden und deren Zytotoxizität nicht blockieren. Gleichzeitig kann vermutet werden, daß eine effektive Antigenerkennung der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen erst aufgrund der Dimerisierung der cIgTCR-Konstrukte über ihre humane Fc-„Spacer“-Domäne möglich wurde. Dadurch wurde zwar das Zielspektrum der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen auf Tumorzellen mit homodimeren CEA-Komplexen eingeschränkt, aber andererseits einer inhibitorischen Wirkung von zirkulierendem CEA entgegengewirkt.

Hombach *et al.* (Hombach et al., 2000a) bewerteten das Einfügen des Fc-Teils in ihr CD30-spezifisches cIgTCR-Konstrukt und die damit verbundene Homodimerisierung des Rezeptors hinsichtlich einer inhibitorischen Wirkung durch das gelöste Antigen kritisch. Sie ermittelten, daß die scFv-Fc- γ -transfizierten T-Zellen (mit Fc-„Spacer“-Domäne) bei einer 5 –

10-fach geringeren Konzentration an freiem CD30 gehemmt wurden verglichen mit T-Zellen, die mit dem scFv- γ -Rezeptorkonstrukt (ohne Fc-„Spacer“-Domäne) transfiziert waren. Die Autoren erwähnten in ihrer Diskussion jedoch nicht, daß sie ein CD30-Fc-Fusionsprotein als gelöstes Antigen einsetzten. Das CD30-Fc-Dimer kann mit den homodimeren scFv-Fc- γ -Rezeptoren eine bivalente Bindung und mit den monomeren scFv- γ -Rezeptoren nur eine schwache monovalente Bindung eingehen. Die im Serum zirkulierenden CD30-Monomere können dagegen nur monovalent an beide cIgTCR-Arten binden. Deshalb sollte die über den Fc-„Spacer“-vermittelte Dimerisierung des scFv-Fc- γ -Konstruktes unter physiologischen Bedingungen keinen Nachteil bezüglich einer Hemmung durch freies CD30 spielen.

Die Dimerisierung der cIgTCR-Konstrukte könnte jedoch in Abhängigkeit von ihrer Affinität und Avidität sowie von der Struktur des Antigens in seiner membrangebundenen und gelösten Form einen großen Einfluß auf die Inhibition durch gelöstes Antigen ausüben.

Einfluß von gelöstem Antigen mit multiplen Epitopen auf die Zytotoxizität der cIgTCR⁺-YT-Zellen

Die Ausführungen des vorigen Abschnitts legen nahe, daß homodimere cIgTCRs durch gelöstes Antigen mit multiplen Epitopen bei physiologischen Konzentrationen blockiert werden könnten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen gegenüber phOx-markierten Zielzellen in Gegenwart von gelöstem PhOx-BSA mit einzelnen oder multiplen PhOx-Gruppen untersucht. Das BSA-Protein wurde hierfür mit dem zweifachen oder 20-fachen molaren Überschuß an PhOx gelabelt. Außerdem wurde die Bindungshemmung des scPhOx-hFc-Proteins bei verschiedenen Konzentrationen dieser gelösten Antigene untersucht, um Rückschlüsse auf die Anzahl blockierter cIgTCRs auf den scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen ziehen zu können.

Die Lyse der PhOx-markierten Zielzellen durch die scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/mL}$ ($= 1 - 2 \times 10^{-8} \text{ M}$) an gelöstem (PhOx)₂₀-BSA fast vollständig blockiert, während bei der 100-fachen Konzentration an gelöstem (PhOx)₂-BSA noch keine Hemmung der Zytotoxizität der scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen beobachtet wurde. Nach Einbeziehung der unterschiedlichen Zahl an PhOx-Gruppen auf den gelösten Antigenmolekülen übt das gelöste PhOx-BSA mit multiplen PhOx-Gruppen immer noch eine mindestens zehnfach stärkere inhibitorische Wirkung auf die scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen aus als das PhOx-BSA mit einzelnen PhOx-Gruppen.

Die 50%ige Bindungshemmung des scPhOx-hFc-Proteins erforderte die 50 – 100-fache Konzentration an gelöstem (PhOx)₂-BSA verglichen mit gelöstem (PhOx)₂₀-BSA. Nach

Berücksichtigung der PhOx-Gruppen auf den Antigenmolekülen entspricht das einem Faktor 5 – 10. Diese Ergebnisse bestätigen, daß das gelöste Antigen mit multiplen Epitopen bei deutlich geringeren Konzentrationen als das Antigen mit einzelnen Epitopen eine Hemmung der Antigenbindung des scFv-hFc-Proteins und der Zytotoxizität der cIgTCR⁺ YT-Zellen bewirkt.

Da das gelöste (PhOx)₂₀-BSA mehrere cIgTCR-Komplexe auf den scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen binden kann, konnte aus der Bindungshemmung des scPhOx-hFc-Protein durch das gelöste (PhOx)₂₀-BSA nicht der Prozentsatz an blockierten Antigenbindungsstellen auf den scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen abgeleitet werden. Im Gegensatz dazu bindet das freie (PhOx)₂-BSA nur an einzelne cIgTCR-Moleküle auf den scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen, so daß aus der Bindungshemmung des scPhOx-hFc-Proteins durch das gelöste (PhOx)₂-BSA eine Aussage über den Anteil blockierter Antigenbindungsstellen auf den scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen getroffen werden kann. Bei einer Konzentration von 100 µg/mL an freiem (PhOx)₂-BSA wurden 60 – 80% des scPhOx-hFc-Proteins an der Antigenbindung gehindert. Bei dieser Konzentration an gelöstem (PhOx)₂-BSA wurde noch keine Hemmung der Zytotoxizität der scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen nachgewiesen. Dementsprechend resultierte aus der Blockierung von mindestens 60 – 80% der cIgTCR-Komplexe auf den scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen durch das gelöste (PhOx)₂-BSA keine Inhibition der Zytotoxizität der scPhOx-hFcζ⁺ YT-Zellen. Wie bei den cIgTCR-transfizierten T-Zellen (Beecham et al., 2000) genügen den cIgTCR⁺ YT-Zellen 20 – 40% der cIgTCR-Antigen-Bindungen, um eine uneingeschränkte Zytotoxizität zu vermitteln.

Zytotoxizität der scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen gegenüber CD33⁺ myeloischen Leukämiezelllinien

Nach dem Gentransfer des CD33-spezifischen cIgTCR-Konstruktes scHuM195-hFcζ in die NK-Zelllinie YT wurde eine spezifische Zytotoxizität gegenüber der CD33⁺ AML-Zelllinie KG1 nachgewiesen. Gegenüber der promyeloischen Leukämiezelllinie HL60 wurde nur eine Lyse von 3% durch die scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen festgestellt. Diese geringe Lyse konnte nicht auf die Erkennungseigenschaften des scHuM195-hFcζ-Rezeptors zurückgeführt werden, da sowohl KG1-Zellen als auch HL60-Zellen durch das scHuM195-hFc-Protein gefärbt wurden. HL60-Zellen werden durch DMSO zur Differenzierung eines granulozytären Phänotyps angeregt (Collins et al., 1978; Collins et al., 1979). Daraus resultierte eine geringfügige Erhöhung der Lyse durch die scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen, während die *mock*- oder scPhOx-hFcζ-transfizierten Effektorzellkontrollen weiterhin keine Zytotoxizität vermittelten. Die DMSO-Stimulation der HL60-Zellen hatte keinen Einfluß auf Expression

von CD33, MHC-Klasse Ia und den kostimulatorischen Molekülen CD80/86, die die Zunahme der Lyse erklären könnte. Im Zusammenhang mit der DMSO-Stimulation wurde jedoch auf einem großen Teil der HL60-Zellen eine Hochregulation des Integrins CD11c nachgewiesen und die Hochregulation weiterer Adhäsionsmoleküle beschrieben (Burchard et al., 1992; Goldberger et al., 1994). Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Zytotoxizität der NK-Zellen (Heiskala et al., 1990) und der YT-Zelllinie (Liu et al., 1994). Sie unterstützen auch die Zytotoxizität cIgTCR-transfizierter T-Zellen (Weijtens et al., 1998b).

Inhibitorische Mechanismen und effektorzellunabhängige antileukämische Effekte

Die Studien mit den scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen lieferten keine eindeutige Erklärung für die geringe Zytotoxizität gegenüber der promyeloischen Leukämiezelllinie HL60. Deshalb kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, wodurch ein effektives *Targeting* der scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen verhindert wurde. Verschiedene Körpergewebe aber auch Tumorzellen können sich vor einer NK-Zellattacke schützen. Die Expression des nichtklassischen MHC-Klasse-Ib-Moleküls HLA-G auf Tumorzellen führt zur Inhibition der Zytotoxizität der YT-Zellen (Rouas Freiss et al., 1997), während keine Hemmung auf die Expression der klassischen MHC-Klasse-Ia-Moleküle zurückgeführt werden konnte (Paul et al., 1998). HLA-G wird nur selten auf Tumorzelllinien nachgewiesen (Polakova und Russ, 2000). In vielen myeloischen Leukämien wird jedoch die mRNA von HLA-G nachgewiesen, ohne daß HLA-G auf der Oberfläche exprimiert wird (Amiot et al., 1996). Die Oberflächenexpression von HLA-G kann auf AML-Blasten durch IFN- γ angeregt werden (Amiot et al., 1998; Mizuno et al., 2000). In dieser Arbeit konnte nicht mehr untersucht werden, ob die IFN- γ -Sekretion der YT-Zellen (Chuang et al., 2000) die HLA-G-Expression auf myeloischen Leukämiezellen anregt und ob daraus die geringe Zytotoxizität der scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen gegenüber den HL60-Zellen resultiert.

Antikörper gegen das in die regulatorischen Prozesse der Myelopoese involvierte CD33 führen zur Hemmung der Proliferation von chronischen myeloischen Leukämiezellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen (Mingari et al., 2001; Vitale et al., 1999) und können die Apoptose in CD33 $^+$ myeloischen Zelllinien auslösen (Vitale et al., 2001a). Derartige effektorzellunabhängige antileukämische Effekte werden als eine Ursache für die Erfolge der Therapien mit dem Antikörper HuM195 bei promyeloischen Leukämien diskutiert (Caron et al., 1998; Caron und Scheinberg, 1993). Die in dieser Arbeit angewendeten ^{51}Cr -Freisetzungssassays können derartige antiproliferative und apoptotische Effekte nicht oder nur

begrenzt identifizieren, so daß eine antileukämische Wirkung des CD33-spezifischen scHuM195-hFc ζ -Rezeptors der transfizierten YT-Zellen nicht ausgeschlossen werden kann.

5.5 Studien mit bestrahlten scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen

Wachstumsinhibition der YT-Zelllinie durch γ -Bestrahlung

Die klinische Anwendung von Effektorzelllinien für eine adoptive Immuntherapie erfordert Maßnahmen, die ihr unbegrenztes Wachstum im Patienten beschränken. In dieser Arbeit wurde die γ -Bestrahlung zur Wachstumsinhibition der YT-Zellen eingesetzt. In Abhängigkeit von der Dosis schädigt die γ -Strahlung das Erbgut von Zellen in einem Maße, daß sie ihre Teilungsfähigkeit vollständig verlieren und weitere Zellteilungen zur Apoptose oder Nekrose der bestrahlten Zellen führen.

Nach einer Bestrahlung mit 2000 rad (= 20 Gy) wurde kein weiteres Wachstum der YT-Zellen beobachtet. In allen Versuchen wirkte sich diese Strahlungsdosis nach wenigen Tagen lethal auf alle bestrahlten YT-Zellen aus. Das frühe Absterben der YT-Zellen nach lethaler Bestrahlung ist auf ihre hohe Proliferationsrate zurückzuführen. Für den klinischen Einsatz der YT-Zelllinie muß die Strahlendosis ausreichend hoch gewählt werden, da strahlenresistente Subpopulationen und eine höhere Strahlungstoleranz verursacht durch Streß (Weinfeld et al., 2001) berücksichtigt werden müssen.

Einfluß der γ -Bestrahlung auf die Zytotoxizität der scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen

Die Bestrahlung könnte weitere Zelleigenschaften beeinflussen. Die Zytotoxizität der CEA-spezifischen scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen gegenüber den CEA⁺ MC32A-Zellen war einen Tag nach γ -Bestrahlung mit der unbestrahlten scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen vergleichbar. Nur bei sehr hohen Strahlungsdosen (> 10000 rad) war eine geringe Abnahme der Lyse zu beobachten, die möglicherweise im Zusammenhang mit der leichten Herunterregulation der cIgTCR-Expression stand. Die Zahl lebender scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen nahm drei Tage nach lethaler Bestrahlung beträchtlich ab und die verbliebenen vitalen scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen vermittelten nur eine deutlich reduzierte Zytotoxizität. Fünf Tage nach lethaler Bestrahlung war nahezu keine Zytotoxizität der bestrahlten scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen gegenüber den CEA⁺ Tumorzellen nachweisbar. Deshalb kann ein effektives Wirken lethal bestrahlter scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen nur innerhalb der ersten beiden Tage nach der Bestrahlung erwartet werden. Eine sichere Wachstumsinhibition der cIgTCR⁺ YT-Zellen durch γ -Bestrahlung ist nur bei gleichzeitiger Einschränkung ihres Effektorpotentials möglich.

Trotzdem stellt die Bestrahlung gegenwärtig die einzige sichere Methode zur Wachstumsinhibition von Zellen und Zelllinien dar. Einige Studien zeigen den Einsatz der zytotoxischen T-Zelllinie TALL-104, die nach Bestrahlung mit 4000 rad in Mäusen (Cesano et al., 1996a; Cesano et al., 1996c; Cesano et al., 1997b), Hunden (Cesano et al., 1996b; Visonneau et al., 1999) und Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs (Visonneau et al., 2000) eingesetzt wurde. Bestrahlte (1000 rad) NK92-Zellen wurden zum *Purging* von Knochenmarkproben aus Leukämiepatienten verwendet (Klingemann und Miyagawa, 1996; Klingemann et al., 1996; Maki et al., 2003). Außerdem laufen Studien mit bestrahlten NK-92-Zellen zur adoptiven Immuntherapie von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen (Tonn et al., 2001).

5.6 Maustumormodell

Der adoptive Transfer bestrahlter scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen zur Bekämpfung minimaler CEA $^+$ Tumore

Die Wirkung der bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurde nach den *in-vitro*-Studien in einem Maustumormodell *in vivo* untersucht. Da Mäuse ein xenogenes System für die humane NK-Zelllinie YT darstellen, wurden immundefiziente NOD/SCID-Mäuse verwendet, die weder T- und B-Zellen noch NK-Zellen besitzen. Als Tumormodell wurden die CEA-transfizierten MC32A-Zellen verwendet, die sich in den *in-vitro*-Studien als ein gutes *Target* für die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen erwiesen hatten. Die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen wurden vor dem adoptiven Transfer mit einer Dosis von 5000 rad lethal bestrahlt.

Im ersten Ansatz wurde die Wirkung bestrahlter scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen auf minimale MC32A-Tumore untersucht. 10^6 MC32A-Tumorzellen wurden direkt vor der Injektion mit 10^7 bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen gemischt und anschließend sofort in die NOD/SCID-Mäuse subkutan injiziert. Die Bildung von CEA $^+$ MC32A-Tumoren wurde durch die gemeinsame Injektion von MC32A-Tumorzellen und bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen signifikant gehemmt. Den Kontrollgruppen wurden MC32A-Tumorzellen zusammen mit PBS oder bestrahlten PhOx-spezifischen scPhOx-hFc ζ^+ YT-Zellen injiziert. Die Mäuse überlebten durch den gemeinsamen adoptiven Transfer von Tumorzellen und bestrahlten scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen 14 – 18 Tage länger als die Kontrollgruppen. Zwei Mäuse dieser Gruppe entwickelten im Gegensatz zu den Kontrollgruppen keinen MC32A-Tumor. Obwohl die Ergebnisse signifikant waren, wirken sich einzelne Abweichungen aufgrund der geringen Gruppengröße überproportional aus.

Der gewählte experimentelle Ansatz ist außerdem sehr künstlich, da niemals Effektorzellen zusammen mit Tumorzellen in einen Patienten injiziert werden. Ein Mausmodell läßt zudem nur eine begrenzte Beschreibung des adoptiven Transfers der humanen cIgTCR⁺ YT-Zelllinie, besonders in Bezug auf eine klinische Anwendung im Menschen, zu. Trotzdem wurde durch diesen Versuch die Wirkung der bestrahlten scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen gegenüber CEA⁺ Tumorzellen *in vivo* gezeigt.

Vergleichbare Experimente wurden von anderen Gruppen mit rezeptorgenmodifizierten CTL durchgeführt. McGuinness *et al.* (McGuinness *et al.*, 1999) konnten drei von vier NOD/SCID-Mäusen durch den adoptiven Transfer humaner T-Zellen, die mit einem TAG72-spezifischen cIgTCR-Konstrukt transfiziert waren, vor der Bildung von TAG72⁺ LS174T-Tumoren schützen, wenn Tumor- und Effektorzellen subkutan koinjiziert wurden. Die intraperitoneale Koinjektion der genmodifizierten TAG72-spezifischen T-Zellen verhinderte bei vier von vier NOD/SCID-Mäusen die Bildung von TAG72⁺ KLE-B-Zelltumoren. Untransfizierte T-Zellen hatten dagegen keinen Effekt auf die Tumorbildung. Bei diesen Experimenten wurden die cIgTCR-transfizierten T-Zellen im Gegensatz zu den scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen dieser Arbeit nicht bestrahlt.

Adoptiver Transfer bestrahlter scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen zur Bekämpfung etablierter CEA⁺ Tumore

In einem weiteren Experiment wurden bestrahlte scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen intratumoral in etablierte CEA⁺ MC32A-Tumore injiziert. Zum Zeitpunkt der ersten Injektion waren viele der subkutan implantierten MC32A-Tumore schon relativ groß ($0,20 \pm 0,13 \text{ cm}^3$). Die zweimalige intratumorale Injektion von jeweils 10^7 bestrahlten scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen im Abstand von einer Woche hatte keinen signifikanten Effekt auf das Wachstum der MC32A-Tumore in den NOD/SCID-Mäusen. Bei kleineren MC32A-Tumoren wurde eine geringfügige Verlangsamung des Wachstums während der Behandlungsphase mit den bestrahlten scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen beobachtet.

Die geringe Wirkung der bestrahlten scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen auf die etablierten CEA⁺ MC32A-Tumore kann darauf zurückgeführt werden, daß die MC32A-Tumore zum Zeitpunkt der ersten Injektion an die NOD/SCID-Mäuse adaptiert waren und ihr Volumen binnen weniger Tage verdoppelten. Im Gegensatz dazu waren die scBW431/26-hFcζ⁺ YT-Zellen nicht an die Bedingungen in den NOD/SCID-Mäusen angepaßt und durch ihre γ -Bestrahlung in ihrem Wirkungspotential erheblich eingeschränkt.

Die Behandlung etablierter Tumore durch den adoptiven Transfer tumorspezifischer Effektorlymphozyten ist ein noch ungelöstes Problem. In einem syngenem Maussystem konnte eine kinetische Abhängigkeit zwischen der Tumorgroße und der Anzahl an adoptiv transferierten antigenspezifischen Maus-CTL, die einen tumorspezifischen TCR exprimierten, bei der Behandlung von Tumoren gezeigt werden. Es konnten sogar größere Tumore effektiv bekämpft werden (Hanson et al., 2000). Die Abhängigkeit von Tumolvolumen und der Anzahl adoptiv transferierter Effektorzellen wurde auch für bestrahlte Zellen der zytotoxischen T-Zelllinie TALL-104 gezeigt. Sie bewirkten nach multiplen intraperitonealen Applikationen, daß kleinere subkutan implantierte humane Tumore (< 150 mg) lokal um 50 – 75% reduziert wurden und die Ausbildung von Lungenmetastasen unterdrückt wurde (Cesano et al., 1998). Deshalb könnte eine erhöhte Zahl an scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen und eine erhöhte Frequenz der Behandlungen zu einer stärkeren Hemmung kleinerer Tumore führen. Eine komplette Beseitigung größerer Tumore ist dagegen unwahrscheinlich.

Die durchgeführten Mausexperimente können aufgrund der geringen Zahl an Tieren pro Gruppe nur ein vorläufiges Ergebnis sein. Tiermodelle beinhalten eine Vielzahl unbekannter Faktoren, die sich erst durch größere Gruppen statistisch erfassen lassen. Die Behandlung von Mäusen mit etablierten Tumoren ist abhängig vom Tumolvolumen, so daß eine Klassifizierung der Tumore nach ihrer Größe erforderlich ist. Gleichzeitig ermöglichen größere Gruppen schwer standardisierbare Methoden, wie die intratumorale Injektion der Effektorzellen, auszugleichen. Die intratumorale Injektion von tumorspezifischen Effektorlymphozyten ist ebenfalls ein künstlicher Ansatz mit einer begrenzten Relevanz für die klinische Anwendung, da ein gut lokalisierbarer Tumor gut durch Operation oder eine gezielte Bestrahlung behandelt werden kann. Trotzdem könnte eine Nachbehandlung des Patienten durch Injektion tumorspezifischer Effektorlymphozyten in den behandelten Tumor bzw. an den Ort des entfernten Tumors eine sinnvolle Ergänzung zur konventionellen Tumorthherapie darstellen. Auf die Kombination von konventionellen Tumorthapien und der adoptiven Immuntherapie wird in einem späteren Abschnitt näher eingegangen.

5.7 Allo gene Abstoßung der clgTCR⁺ YT-Zellen

Abstoßung der clgTCR⁺ YT-Zellen durch allogene Lymphozyten und NK-Zellen

Die Effektivität einer allogenen Effektorzelllinie für eine adoptive Immuntherapie ist auch von der Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem des Tumorpatienten abhängig. In früheren Experimenten wurde eine geringe Empfindlichkeit der YT-Zelllinie gegenüber primären

allogenen Lymphozyten beobachtet. Obwohl YT-Zellen *fas* auf ihrer Oberfläche exprimieren, werden sie nicht über den FasL-*fas*-Mechanismus zerstört (persönliche Mitteilungen von Mike Ziegner). Die Ursache für diese Unempfindlichkeit ist für die YT-Zelllinie noch nicht eingehend untersucht worden. Mögliche Ursachen könnten die Wirkung von Anti-Apoptose-Genen, wie Bcl-2 oder Bcl-X_L (Eischen et al., 2001), der FLIP/FLICE-Mechanismus (Kataoka et al., 1998) oder Defekte in der *Death*-Domäne von *fas* sein. Eine Unempfindlichkeit gegenüber der *fas*-induzierten Apoptose wurde auch für T-Zellen in Abhängigkeit von ihrer Quelle und Aktivierung gezeigt (Shiraki et al., 1997; Walker et al., 2000a; Walker et al., 1997). Die TAG72⁺ Kolonkarzinomzelllinie LS174T, die FasL auf ihrer Oberfläche exprimiert, induzierte keine Apoptose humaner *fas*⁺ T-Zellen, die mit einem TAG72-spezifischen cIgTCR transfiziert waren (McGuinness et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde nur eine sehr geringe Lyse der YT-Zellen durch frisch isolierte periphere Lymphozyten oder NK-Zellen festgestellt. Die Lyse durch allogene PBL und NK-Zellen war gegenüber den cIgTCR-transfizierten YT-Zellen geringfügig erhöht und schien von der Höhe der cIgTCR-Expression abzuhängen. Wahrscheinlich wurde die Lyse durch CD16⁺ T- oder NK-Zellen vermittelt, die die humane Fc-„*Spacer*“-Domäne der cIgTCR-Konstrukte erkennen. Die Erkennungsorte für den Fc(γ)RIIIa-Rezeptor (CD16) sind in der CH₂-Domäne des humanen IgG1-Fc-Teils lokalisiert. In der CH₂-Domäne ist auch die Erkennungsstruktur für den Komplementfaktor C1q vorhanden, so daß eine hohe cIgTCR-Expression auf den YT-Zellen die Komplementreaktion aktivieren könnte. Eine mögliche Komplementaktivierung durch die cIgTCR⁺ YT-Zellen wurde nicht untersucht, jedoch schützen sich viele Körperzellen vor der *low-Level*-Aktivierung des Komplements im Serum durch Expression von CD55 (DAF, *decay-accelerating factor*), CD59 (Protectin) und CD46 (MCP, *membrane cofactor protein*).

McGuinness *et al.* (McGuinness et al., 1999) konstruierten ein cIgTCR-Konstrukt, dessen IgG1-*hinge*-Region unter Deletion der CH₂-Domäne direkt mit der CH₃-Domäne fusioniert war. Die Expression und Funktion dieses cIgTCR-Konstruktes wurde in humanen T-Zellen demonstriert. Die Entfernung der CH₂-Domäne aus den cIgTCR-Konstrukten ist auch für die Genmodifikation der YT-Zelllinie sinnvoll, um einer Attacke von CD16⁺ zytotoxischen Lymphozyten und Neutrophilen sowie einer möglichen Komplementreaktion aus dem Weg zu gehen.

Stimulation allogener Lymphozyten durch die cIgTCR⁺ YT-Zellen

YT-Zellen exprimieren wie andere NK-Zellen kostimulatorische Moleküle und MHC-Moleküle (Klasse-I und -II) und könnten potentiell als antigenpräsentierende Zellen wirken

(Roncarolo et al., 1991). Die Kokultivierung allogener PBL mit bestrahlten *mock*-transfizierten oder cIgTCR⁺ YT-Zellen führte zu keiner Zunahme der Zytotoxizität der „stimulierten“ PBL gegenüber den *mock*- und cIgTCR-transfizierten YT-Zellen. Im Rahmen dieses Ansatzes wurde keine spezifische Stimulation der allogenen PBL durch die *mock*-transfizierten YT-Zellen oder cIgTCR⁺ YT-Zellen nachgewiesen.

Diese *in-vitro*-Experimente lassen nur begrenzte Aussagen zu, ob und wie schnell cIgTCR⁺ YT-Zellen vom Immunsystem eines Patienten eliminiert werden und wie stark ihre Wirkung dadurch eingeschränkt wird. Der adoptive Transfer von bis zu 10⁸ Zellen je kg Körpergewicht der allogenen zytotoxischen T-Zelllinie TALL-104 in Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs wurde gut toleriert und nach wiederholten Injektionen keine zelluläre Immunisierung gegenüber der fremden Effektorzelllinie beobachtet (Visonneau et al., 2000).

Obwohl die Allogenität der YT-Zellen viele Angriffspunkte für eine Abstoßung durch das Immunsystem des Patienten bietet, kann auch die Genmodifikation der YT-Zellen kritisch sein. Insbesondere nichthumane Gene können aufgrund ihrer höheren Immunogenität zu einer Immunreaktion führen. In diesem Zusammenhang kann auch der Selektionsmarker des Vektors problematisch sein (Bordignon et al., 1999; Liberatore et al., 1999). Die in dieser Arbeit konstruierten cIgTCRs wurden aus humanen Komponenten erzeugt und sollten nicht immunogen sein. Aufgrund der humanisierten V-Regionen der scFv-Fragmente können keine HAMAs (*human anti-mouse antibodies*) auftreten, die die cIgTCRs blockieren. Die Bildung von blockierenden Anti-Idiotypen-Antikörpern oder Antikörpern gegen den *Linker* der scFv-Fragmente sind damit jedoch nicht ausgeschlossen.

5.8 Potential der cIgTCR⁺ YT-Zellen für die klinische Anwendung

„Bystander-Killing“ und multispezifische Effektorzellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, daß die Spezifität der humanen NK-Zelllinie YT durch den Gentransfer tumorspezifischer cIgTCR-Konstrukte auf andere Tumorarten erweitert werden kann. Trotzdem stellen sich noch viele Fragen, die im Zusammenhang einer möglichen klinischen Anwendung der cIgTCR⁺ YT-Zellen von Bedeutung sind.

Der Gentransfer der cIgTCR-Konstrukte in die YT-Zellen führte zur spezifischen Lyse der Zielzellen, die das Antigen des Rezeptors auf ihrer Oberfläche exprimierten. Antigen-negative Tumorzellen wurden dagegen durch die cIgTCR⁺ YT-Zellen nicht erkannt und

scheinen unbeeinflusst weiterzuwachsen. Dieses geringe „*Bystander-Killing*“ wurde auch für cIgTCR-transfizierte humane T-Zellen beschrieben (McGuinness et al., 1999). Einerseits werden gesunde Gewebe nicht in Mitleidenschaft gezogen, so daß cIgTCR⁺ YT-Zellen auch zur Behandlung von Tumoren in kritischen Organen, z. B. dem Gehirn, eingesetzt werden könnten. Andererseits ist die Wirkung der cIgTCR⁺ YT-Zellen auf den Teil der Tumorzellen begrenzt, die das Antigen des Rezeptors exprimieren. Die heterogene Antigenexpression auf Tumoren führt bei der Behandlung mit antigenspezifischen cIgTCR⁺ Effektorzellen zur Selektion antigennegativer Tumorzellen (Beecham et al., 2000).

Durch Verwendung multispezifischer Effektorzellen könnte dieses Problem verhindert werden, weil sich dadurch die Wahrscheinlichkeit verringert, daß einzelne Tumorzellen keines der Tumorantigene exprimieren. Allogen immunisierte T-Zellen, die mit einem tumorspezifischen cIgTCR-Konstrukt transfiziert worden waren, zeigten eine cIgTCR-Antigenspezifität gepaart mit Alloreaktivität und eine Antitumorwirkung *in vivo* (Kershaw et al., 2002). Die Transfektion EBV-spezifischer T-Zellen mit einem CD19-spezifischen cIgTCR-Konstrukt führte zu einer dualen Antigenspezifität (Roessig et al., 2002; Rossig et al., 2002). Der Gentransfer von zwei unterschiedlichen cIgTCR-Konstrukten in T-Zellen führte ebenfalls zur Erweiterung ihrer Erkennungseigenschaften (Patel et al., 2000). Genmodifizierte Maus-T-Zellen, die zwei unterschiedliche TCRs mit einer Spezifität für ein Peptid aus dem Ovalbumin (ova257) und dem Lymphozyten-Choriomeningitis-Virus-Glykoprotein gp33 exprimierten, konnten nach adoptivem Transfer das Wachstum von ova257⁺ und gp33⁺ B16-Melanomen supprimieren (Gladow et al., 2004).

Der stabilen Expression von mehreren Transgenen in einer Zelle sind in der Praxis Grenzen gesetzt. Deshalb erscheint der Einsatz von unterschiedlichen YT-Zellen, die jeweils mit einem anderen cIgTCR-Konstrukt transfiziert worden sind, sinnvoller, als die YT-Zelllinie mit mehreren Rezeptorgen auszustatten. Ein Gemisch aus unterschiedlichen rezeptorgenmodifizierten YT-Zellen könnte sogar individuell für den Patienten zusammengestellt werden.

Verbesserung der Effektoreigenschaften der YT-Zellen

Die scHuM195-hFcζ⁺ YT-Zellen erzielten gegenüber den myeloischen Leukämiezelllinien nur eine geringe Lyse, obwohl das Rezeptorantigen auf den Zielzellen mit dem scHuM195-hFc-Protein nachgewiesen werden konnte. Deshalb können große Reserven im Effektorpotential der YT-Zellen vermutet werden. Die Expression von inhibitorischen und aktivatorischen NK-Zellrezeptoren wurde für die YT-Zelllinie noch nicht umfassend durchgeführt. Trotzdem wurden aus den YT-Zellen Subzelllinien mit unterschiedlichen zytotoxischen Eigenschaften isoliert (Lin Chua und Brahmi, 2002; Montel et al., 1995a; Su et al., 1994).

Die Genmodifikation der YT-Zelllinie kann nicht nur zur Erweiterung ihrer Spezifität sondern auch zur Verbesserung ihrer Effektoreigenschaften genutzt werden. Auf diese Weise könnten inhibitorische NK-Zellrezeptoren oder deren Signalwege inaktiviert oder herabreguliert werden (z. B. durch RNAi) oder aktivatorische Rezeptoren und ihre Signalwege verstärkt werden. Die Transfektion von Zytokingenen in Lymphozyten kann deren Effektoreigenschaften steigern (Hwu et al., 1993b), führt jedoch in einigen Fällen zur Apoptose der genmodifizierten Lymphozyten (Ebert et al., 1997). Außerdem können Zytokine, die *in vitro* zytotoxisch auf Tumorzellen wirken, *in vivo* aufgrund komplexer modulatorischer Funktionen das Wachstum von Tumoren fördern oder die Tumormunität supprimieren (Bordignon et al., 1999). Ein lysosomales Protein-*Targeting* durch spezielle Signalsequenzen wurde für den löslichen TNF-Rezeptor-1 in der YT-Zelllinie demonstriert und verhindert eine konstitutive TNFR-1-Sekretion (Hansson et al., 2003). Dieser Ansatz könnte zur Anreicherung anderer zytotoxischer Proteine in den Granula der YT-Zellen genutzt werden, die erst an den Zielzellen freigesetzt werden sollen. Die Transfektion von CD16 in die YT-Zelllinie führte zu allgemein verbesserten zytotoxischen Eigenschaften und einer verstärkten IFN- γ -Sekretion (Deaglio et al., 2002).

Tumortaxis und Applikation der cIgTCR⁺ YT-Zellen

Eine wichtige Eigenschaft von Effektorzellen für eine adoptive Immuntherapie ist die Fähigkeit, zum Ort des Tumors wandern zu können. Eine tumorgerichtete Chemotaxis ist die Voraussetzung für eine intravenöse Applikation der Effektorzellen. In einem Vorexperiment mit fluoreszenzmarkierten YT-Zellen konnte keine spezifische Anreicherung der CEA-spezifischen scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen in CEA⁺ MC32A-Tumoren, die in NOD/SCID-Mäusen etabliert wurden, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Chemotaxis im Menschen und gegenüber humanen Tumoren ist damit jedoch nicht ausgeschlossen.

Moritz *et al.* (Moritz et al., 1994) ermittelten nach intravenöser Injektion fluoreszenzmarkierter Zellen der Maus-CTL-Linie CI96, die mit einem ErbB2-spezifischen cIgTCR transfiziert war, eine spezifische Lokalisation in etablierten ErbB2-transgenen NIH3T3-Tumoren. Das Wachstum dieser Tumore wurde sogar geringfügig gehemmt. Eine über die ζ -Signalkette vermittelte Chemotaxis ist jedoch fraglich und andere Mechanismen des Maus-T-Zellhybrids CI96 müssen diskutiert werden. Biodistributionsversuche mit radioaktiv markierten TALL-104-Zellen, die intravenös in Mäusen injiziert wurden, ergaben zuerst eine Anreicherung in der Lunge, später in der Leber, der Milz und der Niere. Eine beständige Akkumulation der TALL-104-Zellen wurde auch im Tumor und in den Metastasen festgestellt (Cesano et al., 1999).

Wenn die YT-Zellen über keine tumorgerichtete Chemotaxis verfügen und damit eine intravenöse Applikation der scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen zur Behandlung von soliden CEA $^+$ Tumoren und Metastasen ausscheidet, müßte ihre Injektion intratumoral erfolgen, um sie an ihren Wirkungsort zu bringen. Dieser Ansatz macht jedoch wenig Sinn, da er auf gut lokalisierbare Tumore beschränkt ist, die effektiv chirurgisch entfernt werden können. Die scBW431/26-hFc ζ^+ YT-Zellen könnten jedoch an den Ort des chirurgisch entfernten Tumors appliziert werden, um dort restliche Tumorzellen aufzuspüren und zu vernichten.

Eine weitere Möglichkeit besteht im Gentransfer oder der Aktivierung von Chemokinrezeptorgenen in den YT-Zellen. Chemokinrezeptoren nehmen in Abhängigkeit von der Konzentration ihrer Liganden über G-Protein-vermittelte Signalwege Einfluß auf die Polarität und Motilität der Zelle (Mellado et al., 2001; Power, 2003). Die Sekretion verschiedener Chemokine, z. B. IL-8, wurde für Melanome beschrieben (Payne und Cornelius, 2002) und im Überstand von Tumorzelllinien nachgewiesen (Takamori et al., 2000). Viele Chemokine werden auch durch andere Prozesse induziert und sind deshalb meistens nicht tumorspezifisch. Die Chemotaxis in das Körpergewebe, wo der Tumor lokalisiert ist, könnte genügen, die YT-Zellen nahe genug an ihren Wirkungsort zu bringen. Neuronale Stammzellen folgen Tumorzellen über einen noch unbekannten Mechanismus und werden als Vehikel für Chemotherapeutika diskutiert (Aboody et al., 2000; Yip et al., 2003). Fusionsproteine aus Antikörperbindungsdomäne und Chemokinanteil können die Erkennung tumorspezifischer Antikörper mit den chemotaktischen Eigenschaften von Chemokinen koppeln (Challita-Eid et al., 1998).

Neovaskularisierung solider Tumore – Barriere oder Ziel?

Solide Tumore bilden häufig komplexe Strukturen und müssen ab einer Größe von 1 – 2 mm eigene Blutgefäße für ihre Sauerstoff- und Nährstoffversorgung bilden. Diese tumorassoziierten Gefäße werden durch Rekrutierung von Endothelzellen erzeugt und verhindern den direkten Kontakt von Immunzellen oder Antikörpern aus Blut und Lymphe mit dem Tumor. Die bei der Neovaskularisierung hervorgebrachten Endothelzellen unterscheiden sich durch die Expression von VEGF/VEGF-Rezeptorkomplexen (*vascular endothelial growth factor*) gegenüber den Endothelien normaler Gefäße (Brekken und Thorpe, 2001). Eine Zerstörung tumorassoziiierter Gefäße durch VEGF-Rezeptor-Inhibitoren (Shaheen et al., 1999) könnte neben der Antitumorwirkung auch einen direkten Zugang für Lymphozyten aus dem Blut ermöglichen. Endzündliche Prozesse als eine Folgereaktion des Tumorwachstums führen zusammen mit der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf den lokalen Endothelzellen und Leukozyten

(Oberyszyn et al., 1998). IFN- γ , TNF- α und IL-1 β regulieren ICAM-2 herunter, wodurch die Durchlässigkeit zwischen den Endothelzellen erhöht und die Extravasation von Immunzellen erleichtert wird (McLaughlin et al., 1998). Tumorassoziierte neovaskularisierte Endothelien reagieren jedoch schwächer auf diese endzündlichen Prozesse (Griffioen et al., 1996). Die humanen NK-Zelllinien YT und NK92 exprimieren VEGF- β und seinen Rezeptor VEGFR-1 (Flt-1) und adhären *in vitro* unter Einfluß von Angiogenesefaktoren an neugebildete humane Mikrogefäße (Chen et al., 2002). Trotzdem fehlen noch Daten, die ihre Adhäsion an Tumorgefäßen und ihre Migration in das Tumorgewebe *in vivo* belegen.

Ein *Targeting* der YT-Zellen gegen tumorassoziierte Gefäße könnte durch Gentransfer rekombinanter Rezeptoren erreicht werden. Die Transfektion eines chimären Rezeptors mit Spezifität für den angiogenen Endothelzellrezeptor KDR in Lymphozyten führte zur Lyse von KDR⁺ Zellen. Außerdem wurde die Sekretion des Chemokins IL-8 und die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM und E-Selektin in HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) induziert, die eine wichtige Rolle für die Immunantwort am Tumor spielen (Kershaw et al., 2000). Die Konstruktion eines Fusionsrezeptors aus dem Disintegrin Kistrin, das hochaffin an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf angiogenen Endothelzellen bindet, mit der Transmembrandomäne des Adhäsionsmoleküls CD31 (PECAM-1) führte nach Transfektion in Lymphozyten zu deren Akkumulation im Tumor (Wiedle et al., 1999). Als weitere Ziele neovaskularisierter Gefäße werden CD44 (Griffioen et al., 1997) oder der *Tissue*-Faktor (Ran et al., 1998; Rickles et al., 2001) diskutiert.

Behandlung von myeloischen Leukämien mit den scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen

Die Zytotoxizität der CD33-spezifischen scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen war gegenüber den myeloischen Leukämiezelllinien aus noch ungeklärten Gründen gering. Weiterhin ist für eine klinische Anwendung problematisch, daß CD33 kein „tumorspezifisches“ Antigen ist. CD33 wird auf myelomonozytären Vorläuferzellen exprimiert und geht erst auf reifen Granulozyten verloren (Kansas et al., 1990). Gesunde CD33⁺ Leukozyten können die Wirkung der scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen zusätzlich einschränken. Nebenwirkungen aufgrund der Zerstörung gesunder CD33⁺ Vorläuferzellen durch die scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen sollten dagegen nur vorübergehend auftreten, da sie aus CD33⁻ hämatopoetischen Stammzellen regeneriert werden. Antikörpertherapien zeigen, daß eine CD33-spezifische Therapiestrategie bei myeloischen Leukämien trotz eingeschränkter Tumorspezifität durchführbar und wirksam ist (Burke et al., 2002; Caron et al., 1995; Caron und Scheinberg, 1993; Kossman et al., 1999). Die scHuM195-hFc ζ^+ YT-Zellen könnten auch zur Behandlung des myelodysplastischen Syndroms (MDS) eingesetzt werden, das ein hohes Leukämierisiko besitzt

(Matthews, 1998; Schwartz et al., 1993). Zum Zielspektrum der NK-Zelllinie YT gehören B-Zelllinien, so daß die YT-Zellen zur Behandlung von B-Zelltumoren eingesetzt werden könnten.

Alternativen zur Wachstumsinhibition der YT-Zellen

Die Wachstumsinhibition der cIgTCR⁺ YT-Zellen durch γ -Bestrahlung ist mit einer erheblichen Verringerung ihres Effektorpotentials verbunden. Unbestrahlte cIgTCR⁺ YT-Zellen verfügen über eine größere Effektorwirkung, sind aber in ihrem klinischen Einsatz nicht sicher. Eine alternative Methode zur γ -Bestrahlung der cIgTCR⁺ YT-Zellen könnte durch ihre stabile Transfektion mit Suizidgenen erreicht werden (Lal et al., 2000), die nichttoxische Vorstufen (*prodrugs*) in zytotoxische Verbindungen umsetzen. Die Cytosin-desaminase (Wirkstoff: 5'-Fluorouracil) und die Thymidinkinase (Wirkstoff: Ganciclovir) bewirken sogar ein „*Bystander-Killing*“ (Degreve et al., 1999; Mesnil und Yamasaki, 2000; Nishihara et al., 1998), das eine zusätzliche Antitumorwirkung erzielen könnte. Suizidgenstrategien zeigten unbefriedigende Ergebnisse bei allogenen Donorlymphozyten, um die durch sie ausgelöste GvHD zu verhindern (Bordignon et al., 1999). Dementsprechend ist mit Suizidgenstrategien keine sichere klinische Anwendung der cIgTCR⁺ YT-Zellen möglich.

Kombination von konventioneller Tumorthérapien mit der adoptiven Immuntherapie

Die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Publikation belegen, daß die adoptive Immuntherapie nicht als Primärtherapie zur Behandlung größerer Tumore eingesetzt werden kann. Dagegen gibt es gute Gründe für die Kombination konventioneller Tumorthérapien (Operation, Strahlen- und Chemotherapie) mit der adoptiven Immuntherapie, da beide Therapieformen voneinander profitieren. Mit den konventionellen Tumorthérapien können große Tumorumina erheblich reduziert werden, wozu gegenwärtig kein adoptiver Immuntherapieansatz in der Lage ist. Im Gegensatz dazu könnten adoptiv transferierte tumorspezifische Lymphozyten kleinste verbliebene Tumorherde aufspüren und vernichten, die die konventionelle Tumorthérapie überstanden haben. Bei diesen minimalen Resterkrankungen (*minimal residual diseases*) handelt es sich häufig um wenige Tumorzellen, aus denen jedoch schnell ein Tumorrezidiv hervorgehen kann.

Synergistische Effekte von Chemotherapie und dem adoptiven Transfer von LAK-Zellen (+ IL-2) wurden gezeigt (Kawata et al., 1990; Kawata et al., 1995). Die chirurgische Entfernung der Primärtumormasse subkutan implantierter humaner Tumore in Mäusen führte

zu einer verbesserten Antitumorwirkung adoptiv transferierter bestrahlter Zellen der zytotoxischen T-Zelllinie TALL-104 (Cesano et al., 1998). Die Chemotherapie mit Adriamycin ergab in Kombination mit dem adoptiven Transfer von TALL-104-Zellen eine bessere Prognose (Cesano et al., 1997a). Der Einsatz von Cyclophosphamid verringerte die tumorinduzierte Suppression von T-Zellen (Awwad und North, 1988; North, 1982). Die Transfektion des *Multi-Drug-Resistance*-Gens (*mdr1*, P-Glykoprotein) in die YT-Zelllinie bewirkte eine stärkere Resistenz gegen R-Verapamil. Die zytotoxischen Mechanismen der *mdr1*-transfizierten YT-Zellen wurden dadurch kaum beeinflusst (N'Cho et al., 1999), so daß *mdr1*⁺ YT-Zellen sogar während einer Chemotherapie eingesetzt werden könnten.

Einfluß cIgTCR⁺ YT-Zellen auf die Tumorimmunität des Patienten

Das Immunsystem des Tumorpatienten kann nicht nur als potentieller Inhibitor der adoptiv transferierten cIgTCR⁺ YT-Zellen sondern auch synergistisch wirken. Eine NK-Zellantwort geht bei viralen Infektionen einer T-Zellantwort voraus. Aktivierte NK-Zellen stimulieren über die Sekretion von IFN- γ die Th1-Antwort und damit die Bildung antigenspezifischer CTL. Tumorspezifische CTL gelten als die wichtigste „Waffe“ des Immunsystems im Kampf gegen Tumorzellen. Die humane NK-Zelllinie YT zeigt einen aktivierten Phänotyp (Yamabe et al., 1997) und sekretiert IFN γ (Chuang et al., 2001; Johnson et al., 2000). Die Wirkung der YT-Zellen auf das Immunsystems eines Patienten bedarf noch einer eingehenden Untersuchung.

Vorbereitung der cIgTCR⁺ YT-Zellen für klinische Studien

Für den klinischen Einsatz genmodifizierter YT-Zellen müssen standardisierte Chargen unter klinischen GMP-Bedingungen (*good manufacturing practise*) hergestellt werden. Ausgangspunkt ist die Etablierung eines Zellstammes aus der YT-Zelllinie, der auf Viren, Mykoplasmen und andere Mikroorganismen getestet sein muß. Aus diesem standardisierten und gut charakterisierten Zellstamm muß der Gentransfer der cIgTCR-Konstrukte erfolgen. Die Stabilität der genetischen Modifikation und der Eigenschaften der YT-Zellen muß beim Herstellungsprozeß gewährleistet werden, um definierte Chargen der cIgTCR⁺ YT-Zellen erzeugen zu können. Ein Schwerpunkt ist das Einfrieren der cIgTCR⁺ YT-Zellen zur Lagerung und das Auftauen ohne größeren Funktionsverlust vor der Anwendung. Die Expansion und Herstellung von standardisierten Chargen unter klinischen GMP-Bedingungen wurde für die humanen zytotoxischen Zelllinien TALL-104 (Visonneau et al., 2000) und NK92 (Tam et al., 2003) beschrieben.

Schlußfolgerungen

Die humane NK-Zelllinie YT verfügt über nützliche Eigenschaften für den Einsatz bei einer adoptiven Immuntherapie. Sie läßt sich *in vitro* ohne Zugabe von IL-2 in beliebigen Mengen expandieren und verfügt trotzdem über potente zytotoxische Effektoreigenschaften. Außerdem können YT-Zellen mit Plasmiden durch Elektroporation genetisch modifiziert werden.

Die Zytotoxizität der YT-Zelllinie läßt sich durch den Gentransfer tumorspezifischer cIgTCR-Konstrukte auf andere Tumorarten erweitern. Die cIgTCR⁺ YT-Zellen lysieren spezifisch rezeptorantigenexprimierende Tumorzellen. Sie können für eine sichere klinische Anwendung durch γ -Bestrahlung in ihrem Wachstum begrenzt werden, ohne daß ihre Spezifität und zytotoxischen Eigenschaften verändert werden. Der zeitliche Umfang ihrer Wirkung wird aber durch die Bestrahlung eingeschränkt. Der adoptive Transfer bestrahlter scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen führt zu einer signifikanten Hemmung des Wachstums minimaler CEA⁺ MC32A-Tumore. Im Gegensatz dazu wird das Wachstum etablierter größerer Tumore durch die intratumorale Injektion bestrahlter scBW431/26-hFc ζ ⁺ YT-Zellen kaum beeinflußt. Deshalb könnte der adoptive Transfer tumorspezifischer cIgTCR⁺ YT-Zellen zur Therapie minimaler Resterkrankungen nach konventionellen Tumorthapien zu einer verbesserten Prognose für den Patienten führen.

Im Zusammenhang mit der Chemotaxis und den Effektoreigenschaften besitzen die YT-Zellen noch große Reserven, so daß das Wirkungspotential der YT-Zellen in Zukunft verbessert werden könnte. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich tumorspezifische genmodifizierte Effektorzellen auf Basis der YT-Zelllinie herstellen lassen, die für die gezielte adoptive Immuntherapie von Tumorerkrankungen eingesetzt werden können.

Anhang

Plasmidkarten

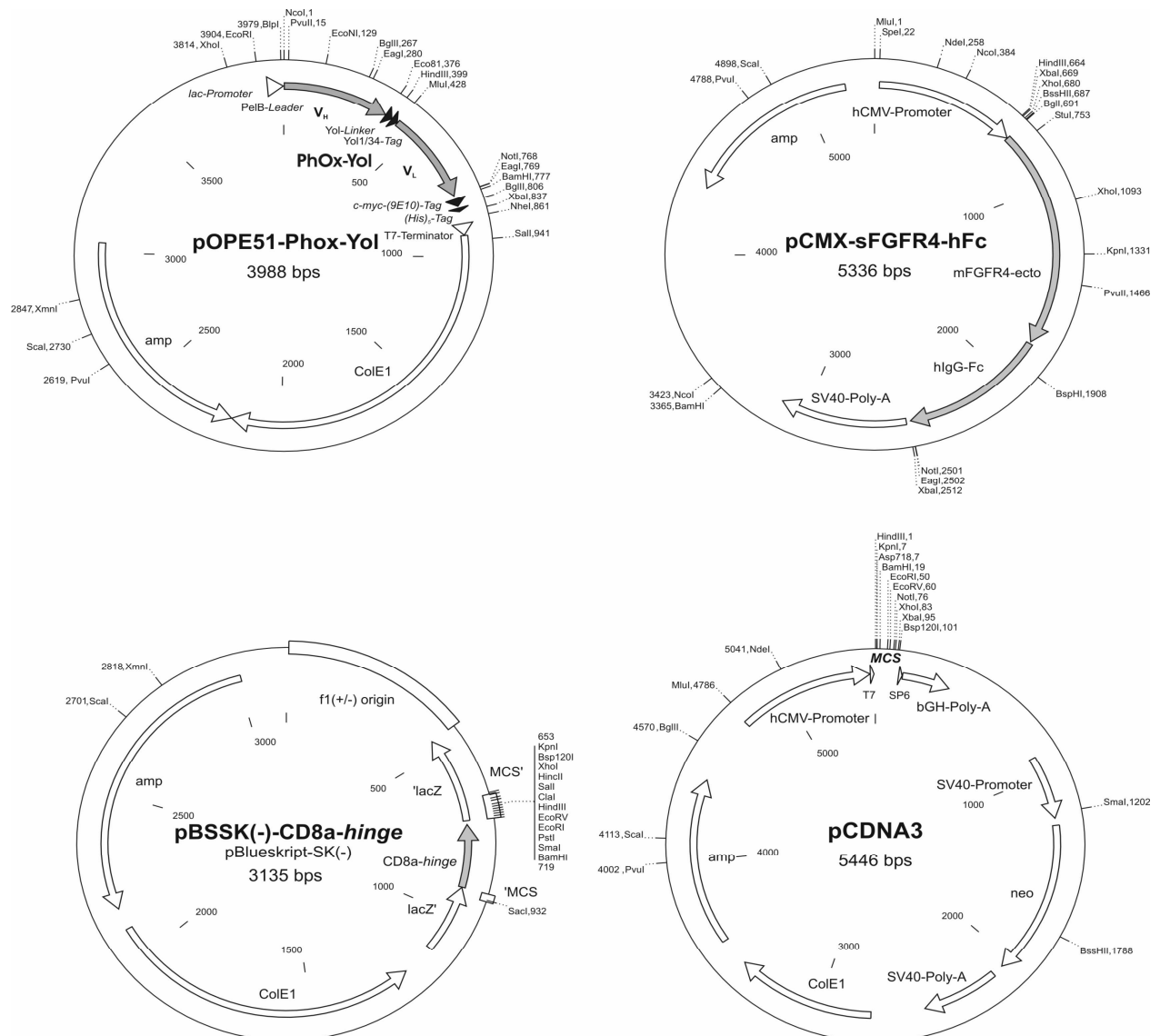


Abbildung 46 – Restriktionskarten für die Ausgangsplasmide

Das Plasmid pOPE51-PhOx-Yol wurde für die Konstruktion der scFv-Fragmente und ihre periplasmatische Expression in *E. coli* verwendet. Das Plasmid pCMX-sFRFG4-hFc war Quelle für den humanen IgG1-Fc-Teil und wurde zur Konstruktion und Expression der scFv-hFc-Proteine eingesetzt. Das Blueskript-Plasmid (mit der CD8 α -*hinge*-Region) kam bei der Isolierung der humanen CD3 ζ -Kette zum Einsatz. Das Expressionsplasmid pCDNA3 diente zur Klonierung und Expression der clgTCR-Konstrukte.

Bezugsquellen

Amersham Biosciences Europe GmbH u. a. Pharmacia, USB (United States Biochemicals)

Munzinger Strasse 9, D-79111 Freiburg

Tel.: 0761-4903-0, Fax: 0761-4903-159

www.amersham.com

ATCC, Rockville, USA, LGC Promochem, Dt.-Österreich

Mercatorstr. 51, D-46485 Wesel

Tel.: 0281-9887-230, Fax: 0281-9887-239

www.atcc.org

Beckman Coulter GmbH (Coulter), u. a. Immunotech

Europark Fichtenhain B 13, D-47807 Krefeld

Tel.: 02151-3335, Fax: 02151-333633

www.coulter.com

Becton Dickinson (BD) Biosciences, u. a. Falcon, Clontech

Tullastrasse 8-12, D-69126 Heidelberg

Tel.: 06221-305-0

www.bd.com

Biometra biomedizinische Analytik GmbH, u. a. **Whatman**

Rudolf-Wissel-Straße 30, D-37079 Göttingen

Tel.: 0551-506860, Fax: 0551-5068666

www.biometra.de

Bio-Rad Laboratories GmbH

Heidemannstraße 164, D-80939 München

Tel.: 089-31884-0, Fax: 089-31884100

www.bio-rad.com

Biotez Berlin-Buch GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, D-13125 Berlin

Tel.: 030-94892130, Fax: 030-9494509

www.biotez.de

Biowhittaker Europe s.p.r.l.

Parc Industriel de Petit-Rechain, 4800 Verviers, Belgien

Tel.: +32-87321611, Fax: +32-87351967

www.cambrexbioproductseurope.com

Biozym Diagnostic GmbH

Postfach, D-31833 Hess. Oldendorf

Tel.: 05152-2075, Fax: 05152-2070

www.biozym.com

Boehringer Ingelheim Bioproducts GmbH
Carl-Benz-Straße 7, D-69115 Heidelberg
Tel.: 06221-5020, Fax: 06221-502113

Boehringer Mannheim, s. Roche Diagnostics

B. Braun Melsungen AG
Carl-Braun-Straße 1, D-34212 Melsungen
Postfach 1120, D-34209 Melsungen
Tel.: 05661-71-0, Fax: 05661-71-4567
www.bbraun.de

Brunswick (Global Medical Instrumentation, Inc.)
6511 Bunker Lake Boulevard
Ramsey, Minnesota 55303
Tel.: +1-763-7128717, Fax: +1-763-4970176
<http://www.gmi-inc.com/>

Calbiochem-Novabiochem GmbH
Lisztweg 1, D-65812 Bad Soden
Tel.: 06196-63955, Fax: 06196-62361
www.calbiochem.com

Packard Instruments Co. Inc., Canberra
siehe Perkin Elmer
www.packardinst.com

Charles River (Deutschland)
Sandhofer Weg 7, D-97633 Sulzfeld
Tel.: 09761-406-0, Fax: 09761-406-60
www.criver.com

Costar GmbH
Am Kümmerling 21-25, D-55294 Bodenheim
Tel.: 06135-92150, Fax: 06135-5148

Dako
A/S 42, DK-2600 Glostrup, Dänemark
Tel.: +45-44859500, Fax: +45-44859595
www.dako.com, www.dakousa.com

Dianova, Gesellschaft für biochem., immun. und mikrobiolog. Diagnostik mbH
Mittelweg 176, D-20148 Hamburg
Tel.: 040-45067-0, Fax: 040-45067-490
www.dianova.de

DuPont NEN, DuPont de Nemours Deutschland GmbH
DuPont-Straße 1, D-61343 Bad Homburg
Tel.: 06172-872600, Fax: 06172-872540

EPO GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, D-13092 Berlin-Buch

Tel.: 030-94062295, Fax: 030-94063823

www.epo-berlin.de

Eppendorf GmbH

Tel.: 0180-366-0, Fax: 040-53801556

www.eppendorf.com

Eurogentec Deutschland

Cäcilienstrasse 46, D-50667 Köln

Tel.: 0221-2589455, Fax: 049-2212589454

www.eurogentec.de

Gibco-BRL

heute: Invitrogen

www.lifetechnologies.com/

Gilson International B.V.

Laan van 's-Gravenmade 80,

2495 AJ DEN HAAG The Netherlands

Tel.: +31-70-3073600, Fax: +31-703073699

www.gilson.com

Greiner Bio-One GmbH

Maybachstraße 2, D-72636 Frickenhausen

Tel.: 07022-9480, Fax: 07022-948514

www.gbo.com/

Heraeus Sepatech, über Kendro

INTEGRA Biosciences GmbH

D-35461 Fernwald

Tel.: 06404-8090, Fax: 06404-5865

www.integra-biosciences.de

InViTek

Robert-Rössle-Str.10; D-13125 Berlin

Tel.: 030-9489-3796, Fax; 030-9489-3795

www.invitek.de

Invitrogen GmbH

Technologiepark Karlsruhe

Emmy-Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe

Tel.: 0800-0830902, Fax: 0800-0833435

www.invitrogen.com

The Jackson Laboratory

600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609, USA

Tel.: +01-207-288-6000

www.jax.org

Kendro

Postfach 1220, D-3360 Osterode/Harz

Tel : 05522-3160, Fax : 05522-316119

www.kendro.de

Labotect GmbH, Labortechnik Göttingen

Willi Eichler Str. 25, D-37079 Göttingen

Tel.: 0551-50501-12, Fax: 0551-68309

www.labotect.com

MBI Fermentas GmbH

Opelstraße 9, D-68789 St.Leon-Rot

Tel.: 06227-356790, Fax : 06227-53694

www.fermentas.de

Memmert GmbH+Co.KG

D-91107 Schwabach/Germany

Tel.: 09122/925-0, Fax: 09122/14585

www.memmert.com/

Millipore GmbH

Postfach 5647, D-65731 Eschborn

Tel.: 06196-4940, Fax: 06196-494163

www.millipore.com

Miltenyi Biotec GmbH

Friedrich-Ebert-Str. 68

D-51429 Bergisch Gladbach

Tel.: 02204-8306-0, Fax: 02204-85197

www.miltenyibiotec.com

Molecular Probes Europe BV

Poortgebouw, Rijnsburgerweg 10, 2333 AA Leiden, Niederlande

Tel.: +31-71-5233378, Fax: +31-71-5233419

www.molecularprobes.com

NEB, New England Biolabs GmbH

Brüningstr. 50, D-65926 Frankfurt am Main

Tel.: 069-30523140, Fax: 069-30523149

www.neb.com

Nunc GmbH & Co. KG

Postfach 12 05 43, D-65083 Wiesbaden

Tel.: 0611-18674-0, Fax: 0611-18674-74
www.nunc.de, www.nalgenunc.com

Nycomed, jetzt AXIS-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen, Vertrieb der Gradienten durch Gibco/Invitrogen

Perkin Elmer LAS GmbH
Ferdinand Porsche Ring 17, D-63110 Rodgau-Jügesheim
Tel.: 0800-1810032, Fax: 0800-1810031
<http://de.instruments.perkinelmer.com/>

Pharmacia siehe Amersham

Promega Deutschland GmbH
High-Tech-Park, Schildkrötstraße 15, D-68199 Mannheim
Tel.: 0621-85010, Fax: 0621-8501222
www.promega.com

Qiagen GmbH
Max-Volmer-Straße 4, D-40724 Hilden
Tel.: 02103-892230, Fax: 02103-892233
www.qiagen.com

Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
Benzstraße 4, D-75334 Straubenhardt
Tel.: 07082-92550, Fax: 07082-20813

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116, D-68305 Mannheim
Tel.: 0621-7598545, Fax: 0621-7598509
www.roche.com

Roth, Carl Roth GmbH & Co
Schoemperlenstraße 1-5, D-76185 Karlsruhe
Tel.: 0721-56060, Fax: 0721-5606149
www.Carl-Roth.de

Sanyo Fisher Sales GmbH
Stahlgruberring 4, D-81829 München
Tel.: 089-451160, Fax: 089-45116101
www.sanyo.de

Sartorius AG
Weender Landstraße 94-108, D-37075 Göttingen
Tel.: 0551-3080, Fax: 0551-308553

Schleicher & Schüll GmbH
Postfach 4, D-37582 Dassel
Tel.: 05561-7910, Fax: 05561-791533

Serva Electrophoresis GmbH
Carl-Benz-Str. 7, D-69115 Heidelberg
Tel.: 06221-13840-0
www.serva.de

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Eschenstr. 5, 82024 Taufkirchen
Tel.: 089-6513-0, Fax: 089-6513-1169
www.sigma-aldrich.com

Stratagene GmbH
Postfach 105466, D-69044 Heidelberg
Tel.: 06221-400634, Fax: 06221-400639
www.stratagene.com

Taylor-Wharton
D-25804 Husum
Tel.: 04841-9850, Fax: 04841-985130
www.taylor-wharton.com

TPP, Techno Plastic Products AG
Zollstrasse 155, CH-8219 Trasadingen
Tel.: +41-52-6870187, Fax: +41-52-6814115
www.tpp.ch

Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co.
Haidösch 1, D-88239 Wangen im Allgäu
Tel.: 07522-986-0, Fax: 07522-986-418

Eigene Veröffentlichungen

T. Schirrmann & G. Pecher (**2005**) Specific targeting of CD33⁺ leukemia cells by a Natural Killer cell line modified with a chimeric receptor. *Leuk Res*, **29**, 301-6

T. Schirrmann & G. Pecher (**2002**) Human natural killer cell line modified with a chimeric immunoglobulin T-cell receptor gene leads to tumor growth inhibition in vivo. *Cancer Gene Ther*, **9**, 390-8.

T. Schirrmann & G. Pecher (**2001**) Tumor-specific targeting of a cell line with natural killer cell activity by asialoglycoprotein receptor gene transfer. *Cancer Immunol Immunother*, **50**, 549-56.

G. Pecher, T. Schirrmann, L. Kaiser & J. A. Schenk (**2001**) Efficient cryopreservation of dendritic cells transfected with cDNA of a tumour antigen for clinical application. *Biotechnol Appl Biochem*, **34**, 161-6.

G. Pecher, G. Spahn, T. Schirrmann, H. Kulbe, M. Ziegner, J. A. Schenk & V. Sandig (**2001**) Mucin gene (MUC1) transfer into human dendritic cells by cationic liposomes and recombinant adenovirus. *Anticancer Res*, **21**, 2591-6.

Patentanmeldung WO 02/088336A2 – Veröffentlichungsschrift vom 30.10.2002

G. Pecher, T. Schirrmann - Genmodifizierte YT Zelllinie und ihre Verwendung

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei PD Dr. Gabriele Pecher für die Vergabe dieses interessanten Themas bedanken und den großen Spielraum den Sie mir bei der Umsetzung ließ. Ebenso möchte ich Prof. Dr. Wolfgang Uckert für seine hilfreiche Diskussion danken. Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Mike Ziegner, Dr. Hagen Kulbe, Arnt Hähring, Dr. Heiko Johnen und Ulf Harnack, die an dieser Arbeit nicht zuletzt aufgrund der angenehmen Arbeitsatmosphäre einen großen Anteil hatten. Ich glaube, daß fast jeder Doktorand eine Zeit durchmachen wird, in der die Fragestellung der Arbeit unlösbar erscheint und „geteiltes Leid ist eben doch nur halbes Leid“. Außerdem gibt es wohl kaum etwas, was sich nicht durch ein kaltes Bier an einem warmen sonnigen Tag vergessen läßt. Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Martin Lipp und seiner Forschungsgruppe insbesondere bei Dr. Günter Bernhardt und Dr. Christian Ried bedanken. Dr. Iduna Fichtner, Frau Becker und Frau Lemm möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung der Mausexperimente danken. Jörg Schenk und Prof. Dr. Stefan Dübel möchte für die Bereitstellung des Plasmids pOPE51 und des scFv-Konstruktes PhOx-Yol sowie für die Informationen über die bakterielle Expression von scFv-Fragmenten danken. Dr. Martin Seidensticker danke ich für die Bereitstellung des pCMX-sFGFR4-Plasmids. Am Schluß möchte ich noch besonders meiner Familie und meinen Freunden danken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig verfaßt habe. Die Ergebnisse wurden durch meine experimentelle Arbeit erhalten. Die verwendeten Materialien, Hilfsmittel, Methoden und Quellen wurden angegeben.

Thomas Schirrmann

Hohen Neuendorf, den 6. November 2004

Literaturverzeichnis

- Aboudy, K. S.; Brown, A.; Rainov, N. G.; Bower, K. A.; Liu, S.; Yang, W.; Small, J. E.; Herrlinger, U.; Ourednik, V.; Black, P. M.; Breakefield, X. O. und Snyder, E. Y. (2000): Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [23], Seite 12846-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11070094
- Aebersold, P.; Hyatt, C.; Johnson, S.; Hines, K.; Korcak, L.; Sanders, M.; Lotze, M.; Topalian, S.; Yang, J. und Rosenberg, S. A. (1991): Lysis of autologous melanoma cells by tumor-infiltrating lymphocytes: association with clinical response, *J Natl Cancer Inst* 83 [13], Seite 932-7.
- Akamatsu, Y.; Murphy, J. C.; Nolan, K. F.; Thomas, P.; Kreitman, R. J.; Leung, S. O. und Junghans, R. P. (1998): A single-chain immunotoxin against carcinoembryonic antigen that suppresses growth of colorectal carcinoma cells, *Clin Cancer Res* 4 [11], Seite 2825-32.
- Altenschmidt, U.; Kahl, R.; Moritz, D.; Schnierle, B. S.; Gerstmayer, B.; Wels, W. und Groner, B. (1996): Cytolysis of tumor cells expressing the Neu/erbB-2, erbB-3, and erbB-4 receptors by genetically targeted naive T lymphocytes, *Clin Cancer Res* 2 [6], Seite 1001-8.
- Altenschmidt, U.; Klundt, E. und Groner, B. (1997): Adoptive transfer of in vitro-targeted, activated T lymphocytes results in total tumor regression, *J Immunol* 159 [11], Seite 5509-15.
- Amiot, L.; Onno, M.; Drenou, B.; Monvoisin, C. und Fauchet, R. (1998): HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells, *Hum Immunol* 59 [8], Seite 524-8.
- Amiot, L.; Onno, M.; Renard, I.; Drenou, B.; Guillaudeux, T.; Le Bouteiller, P. und Fauchet, R. (1996): HLA-G transcription studies during the different stages of normal and malignant hematopoiesis, *Tissue Antigens* 48 [5], Seite 609-14.
- Anand, N. N.; Mandal, S.; MacKenzie, C. R.; Sadowska, J.; Sigurskjold, B.; Young, N. M.; Bundle, D. R. und Narang, S. A. (1991): Bacterial expression and secretion of various single-chain Fv genes encoding proteins specific for a Salmonella serotype B O-antigen, *J Biol Chem* 266 [32], Seite 21874-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1939211
- Annenkov, A. E.; Moyes, S. P.; Eshhar, Z.; Mageed, R. A. und Chernajovsky, Y. (1998): Loss of original antigenic specificity in T cell hybridomas transduced with a chimeric receptor containing single-chain Fv of an anti-collagen antibody and Fc epsilonRI-signaling gamma subunit, *J Immunol* 161 [12], Seite 6604-13.
- Arakawa, F.; Shibaguchi, H.; Xu, Z. und Kuroki, M. (2002): Targeting of T cells to CEA-expressing tumor cells by chimeric immune receptors with a highly specific single-chain anti-CEA activity, *Anticancer Res* 22 [6C], Seite 4285-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12553071
- Arase, H.; Arase, N. und Saito, T. (1995): Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells, *J Exp Med* 181 [3], Seite 1235-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7532682
- Asano, R.; Takemura, S.; Tsumoto, K.; Sakurai, N.; Teramae, A.; Ebara, S.; Katayose, Y.; Shinoda, M.; Suzuki, M.; Imai, K.; Matsuno, S.; Kudo, T. und Kumagai, I. (2000): Functional construction of the anti-mucin core protein (MUC1) antibody MUSE11 variable regions in a bacterial expression system, *J Biochem (Tokyo)* 127 [4], Seite 673-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://jb.bcasj.or.jp/127-4/4exazxtx.htm>
- Assenmacher, M. (1992): Combined intracellular and surface staining, Radbruch, A., Flow cytometry and cell sorting, 1. Auflage, Seite 59-64, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Leipzig, New York.

Atkinson, T. P.; Hall, C. G.; Goldsmith, J. und Kirkham, P. M. (2003): Splice variant in TCRzeta links T cell receptor signaling to a G-protein-related signaling pathway, *Biochem Biophys Res Commun* 310 [3], Seite 761-6. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14550268

Atwell, J. L.; Breheney, K. A.; Lawrence, L. J.; McCoy, A. J.; Kortt, A. A. und Hudson, P. J. (1999): scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody Nc10: length of the linker between Vh and Vl domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies, *Protein Eng* 12 [7], Seite 597-604.

Awwad, M. und North, R. J. (1988): Cyclophosphamide (Cy)-facilitated adoptive immunotherapy of a Cy-resistant tumour. Evidence that Cy permits the expression of adoptive T-cell mediated immunity by removing suppressor T cells rather than by reducing tumour burden, *Immunology* 65 [1], Seite 87-92.

Azuma, M.; Cayabyab, M.; Buck, D.; Phillips, J. H. und Lanier, L. L. (1992): Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line, *J Immunol* 149 [4], Seite 1115-23.

Bakker, A. B.; Wu, J.; Phillips, J. H. und Lanier, L. L. (2000): NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals, *Hum Immunol* 61 [1], Seite 18-27.

Batge, B.; Bosslet, K.; Sedlacek, H. H.; Kern, H. F. und Kloppel, G. (1986): Monoclonal antibodies against CEA-related components discriminate between pancreatic duct type carcinomas and nonneoplastic duct lesions as well as nonduct type neoplasias, *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 408 [4], Seite 361-74.

Batra, J. K.; FitzGerald, D.; Gately, M.; Chaudhary, V. K. und Pastan, I. (1990): Anti-Tac(Fv)-PE40, a single chain antibody Pseudomonas fusion protein directed at interleukin 2 receptor bearing cells, *J Biol Chem* 265 [25], Seite 15198-202. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2118522

Baum, R. P.; Hertel, A.; Lorenz, M.; Schwarz, A.; Encke, A. und Hor, G. (1989a): 99Tcm-labelled anti-CEA monoclonal antibody for tumour immunoscintigraphy: first clinical results, *Nucl Med Commun* 10 [5], Seite 345-52.

Baum, R. P.; Lorenz, M.; Hertel, A.; Baew Christow, T.; Schwarz, A. und Hor, G. (1989b): Erfolgreiche immunszintigraphische Tumordetektion mit Technetium-99m-markierten monoklonalen Anti-CEA-Antikörpern. [Successful immunoscintigraphic tumor detection with technetium 99m marked monoclonal anti-CEA antibodies], *Onkologie* 12, Seite 126-9.

Beauchemin, N.; Draber, P.; Dveksler, G.; Gold, P.; Gray-Owen, S.; Grunert, F.; Hammarstrom, S.; Holmes, K. V.; Karlsson, A.; Kuroki, M.; Lin, S. H.; Lucka, L.; Najjar, S. M.; Neumaier, M.; Obrink, B.; Shively, J. E.; Skubitz, K. M.; Stanners, C. P.; Thomas, P.; Thompson, J. A.; Virji, M.; von Kleist, S.; Wagener, C.; Watt, S. und Zimmermann, W. (1999): Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family, *Exp Cell Res* 252 [2], Seite 243-9. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=11501563

Beecham, E. J.; Ortiz Pujols, S. und Junghans, R. P. (2000): Dynamics of tumor cell killing by human T lymphocytes armed with an anti-carcinoembryonic antigen chimeric immunoglobulin T-cell receptor, *J Immunother* 23 [3], Seite 332-43.

Belardelli, F.; Ferrantini, M.; Proietti, E. und Kirkwood, J. M. (2002): Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy, *Cytokine Growth Factor Rev* 13 [2], Seite 119-34. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11900988

Bennett, M.; Yu, Y. Y.; Stoneman, E.; Rembecki, R. M.; Mathew, P. A.; Lindahl, K. F. und Kumar, V. (1995): Hybrid resistance: 'negative' and 'positive' signaling of murine natural killer cells, *Semin Immunol* 7 [2], Seite 121-7. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7579194

- Biassoni, R.; Bottino, C.; Millo, R.; Moretta, L. und Moretta, A. (1999): Natural killer cell-mediated recognition of human trophoblast, *Semin Cancer Biol* 9 [1], Seite 13-8.
- Biassoni, R.; Pessino, A.; Malaspina, A.; Cantoni, C.; Bottino, C.; Sivori, S.; Moretta, L. und Moretta, A. (1997): Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules, *Eur J Immunol* 27 [12], Seite 3095-9.
- Bird, R. E.; Hardman, K. D.; Jacobson, J. W.; Johnson, S.; Kaufman, B. M.; Lee, S. M.; Lee, T.; Pope, S. H.; Riordan, G. S. und Whitlow, M. (1988): Single-chain antigen-binding proteins, *Science* 242 [4877], Seite 423-6.
- Bochan, M. R.; Goebel, W. S. und Brahmi, Z. (1995): Stably transfected antisense granzyme B and perforin constructs inhibit human granule-mediated lytic ability, *Cell Immunol* 164 [2], Seite 234-9.
- Boeckmann, W.; Baum, R. P.; Schuldes, H.; Kramer, W.; Hertel, A.; Baew Christow, T.; Hanke, P.; Jonas, D. und Hor, G. (1990): Tumour imaging of bladder carcinomas and their metastases with 111indium-labelled monoclonal anti-CEA antibody BW 431/26, *Br J Cancer Suppl* 4, Seite 1081-4.
- Bordignon, C.; Carlo-Stella, C.; Colombo, M. P.; De Vincentiis, A.; Lanata, L.; Lemoli, R. M.; Locatelli, F.; Olivieri, A.; Rondelli, D.; Zanon, P. und Tura, S. (1999): Cell therapy: achievements and perspectives, *Haematologica* 84 [12], Seite 1110-49. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.haematologica.it/abstr/bordignon8412.html>
- Boshoff, C. und Weiss, R. (2002): AIDS-related malignancies, *Nat Rev Cancer* 2 [5], Seite 373-82.
- Bosslet, K.; Czech, J.; Lorenz, P.; Sedlacek, H. H.; Schuermann, M. und Seemann, G. (1992): Molecular and functional characterisation of a fusion protein suited for tumour specific prodrug activation, *Br J Cancer* 65 [2], Seite 234-8.
- Bosslet, K.; Luben, G.; Schwarz, A.; Hundt, E.; Harthus, H. P.; Seiler, F. R.; Muhrer, C.; Kloppel, G.; Kayser, K. und Sedlacek, H. H. (1985): Immunohistochemical localization and molecular characteristics of three monoclonal antibody-defined epitopes detectable on carcinoembryonic antigen (CEA), *Int J Cancer* 36 [1], Seite 75-84.
- Bosslet, K.; Steinstrasser, A.; Schwarz, A.; Harthus, H. P.; Luben, G.; Kuhlmann, L. und Sedlacek, H. H. (1988): Quantitative considerations supporting the irrelevance of circulating serum CEA for the immunoscintigraphic visualization of CEA expressing carcinomas, *Eur J Nucl Med* 14 [11], Seite 523-8.
- Bothmann, H. und Pluckthun, A. (2000): The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines, *J Biol Chem* 275 [22], Seite 17100-5.
- Bottino, C.; Castriconi, R.; Pende, D.; Rivera, P.; Nanni, M.; Carnemolla, B.; Cantoni, C.; Grassi, J.; Marcenaro, S.; Reymond, N.; Vitale, M.; Moretta, L.; Lopez, M. und Moretta, A. (2003): Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule, *J Exp Med* 198 [4], Seite 557-67. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12913096
- Boucher, D.; Cournoyer, D.; Stanners, C. P. und Fuks, A. (1989): Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue, *Cancer Res* 49 [4], Seite 847-52.
- Breitling, F. und Dübel, S. (1997): Rekombinante Antikörper, Labor im Focus, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN: 3-8274-0029-5.
- Brekken, R. A. und Thorpe, P. E. (2001): VEGF-VEGF receptor complexes as markers of tumor vascular endothelium, *J Control Release* 74 [1-3], Seite 173-81.
- Brocker, T. (2000): Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells, *Blood* 96 [5], Seite 1999-2001.
- Brumbaugh, K. M.; Binstadt, B. A.; Billadeau, D. D.; Schoon, R. A.; Dick, C. J.; Ten, R. M. und Leibson, P. J. (1997): Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity, *J Exp Med* 186 [12], Seite 1965-74. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jem.org/cgi/content/full/186/12/1965>

- Brumbaugh, K. M.; Perez-Villar, J. J.; Dick, C. J.; Schoon, R. A.; Lopez-Botet, M. und Leibson, P. J. (1996): Clonotypic differences in signaling from CD94 (kp43) on NK cells lead to divergent cellular responses, *J Immunol* 157 [7], Seite 2804-12. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi-bin/Retreiver.cgi/v157n7/2804/2804-abs-frame.html>
- Brutkiewicz, R. R. und Sriram, V. (2002): Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity, *Crit Rev Oncol Hematol* 41 [3], Seite 287-98. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11880205
- Bruynck, A.; Seemann, G. und Bosslet, K. (1993): Characterisation of a humanised bispecific monoclonal antibody for cancer therapy, *Br J Cancer* 67 [3], Seite 436-40.
- Bukowski, R. M.; Rayman, P.; Uzzo, R.; Bloom, T.; Sandstrom, K.; Peereboom, D.; Olencki, T.; Budd, G. T.; McLain, D.; Elson, P.; Novick, A. und Finke, J. H. (1998): Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy, *Clin Cancer Res* 4 [10], Seite 2337-47.
- Burchard, G. D.; Moslein, C. und Brattig, N. W. (1992): Adherence between *Entamoeba histolytica* trophozoites and undifferentiated or DMSO-induced HL-60 cells, *Parasitol Res* 78 [4], Seite 336-40.
- Burke, J. M.; Jurcic, J. G. und Scheinberg, D. A. (2002): Radioimmunotherapy for acute leukemia, *Cancer Control* 9 [2], Seite 106-13. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.moffitt.usf.edu/pubs/ccj/v9n2/pdf/106.pdf>
- Burnet, F. M. (1970): The concept of immunological surveillance, *Prog Exp Tumor Res* 13, Seite 1-27.
- Calogero, A.; de Leij, L. F.; Mulder, N. H. und Hospers, G. A. (2000): Recombinant T-cell receptors: an immunologic link to cancer therapy, *J Immunother* 23 [4], Seite 393-400.
- Campbell, B. J.; Finnie, I. A.; Hounsell, E. F. und Rhodes, J. M. (1995): Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin, *J Clin Invest* 95 [2], Seite 571-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7860740
- Cao, Y.; Karsten, U. R.; Liebrich, W.; Haensch, W.; Springer, G. F. und Schlag, P. M. (1995): Expression of Thomsen-Friedenreich-related antigens in primary and metastatic colorectal carcinomas. A reevaluation, *Cancer* 76 [10], Seite 1700-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8625037
- Caron, P. C.; Dumont, L. und Scheinberg, D. A. (1998): Supersaturating infusional humanized anti-CD33 monoclonal antibody HuM195 in myelogenous leukemia, *Clin Cancer Res* 4 [6], Seite 1421-8.
- Caron, P. C.; Jurcic, J. G.; Scott, A. M.; Finn, R. D.; Divgi, C. R.; Graham, M. C.; Jureidini, I. M.; Sgouros, G.; Tyson, D.; Old, L. J. und et al. (1994): A phase 1B trial of humanized monoclonal antibody M195 (anti-CD33) in myeloid leukemia: specific targeting without immunogenicity, *Blood* 83 [7], Seite 1760-8.
- Caron, P. C.; Lai, L. T. und Scheinberg, D. A. (1995): Interleukin-2 enhancement of cytotoxicity by humanized monoclonal antibody M195 (anti-CD33) in myelogenous leukemia, *Clin Cancer Res* 1 [1], Seite 63-70.
- Caron, P. C. und Scheinberg, D. A. (1993): Anti-CD33 monoclonal antibody M195 for the therapy of myeloid leukemia, *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 2, Seite 1-6.
- Carretero, M.; Llano, M.; Navarro, F.; Bellon, T. und Lopez-Botet, M. (2000): Mitogen-activated protein kinase activity is involved in effector functions triggered by the CD94/NKG2-C NK receptor specific for HLA-E, *Eur J Immunol* 30 [10], Seite 2842-8.
- Cervantes, F.; Pierson, B. A.; McGlave, P. B.; Verfaillie, C. M. und Miller, J. S. (1996): Autologous activated natural killer cells suppress primitive chronic myelogenous leukemia progenitors in long-term culture, *Blood* 87 [6], Seite 2476-85.
- Cesano, A.; Pierson, G.; Visonneau, S.; Migliaccio, A. R. und Santoli, D. (1996a): Use of a lethally irradiated major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line for effective purging of marrows containing lysis-sensitive or -resistant leukemic targets, *Blood* 87 [1], Seite 393-403.

Cesano, A.; Visonneau, S.; Jeglum, K. A.; Owen, J.; Wilkinson, K.; Carner, K.; Reese, L. und Santoli, D. (1996b): Phase I clinical trial with a human major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line (TALL-104) in dogs with advanced tumors, *Cancer Res* 56 [13], Seite 3021-9.

Cesano, A.; Visonneau, S.; Pasquini, S.; Rovera, G. und Santoli, D. (1996c): Antitumor efficacy of a human major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line (TALL-104) in immunocompetent mice bearing syngeneic leukemia, *Cancer Res* 56 [19], Seite 4444-52.

Cesano, A.; Visonneau, S.; Rovera, G. und Santoli, D. (1997a): Synergistic effects of adriamycin and TALL-104 cell therapy against a human gastric carcinoma in vivo, *Anticancer Res* 17 [3C], Seite 1887-92.

Cesano, A.; Visonneau, S. und Santoli, D. (1998): TALL-104 cell therapy of human solid tumors implanted in immunodeficient (SCID) mice, *Anticancer Res* 18 [4A], Seite 2289-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9703868

Cesano, A.; Visonneau, S.; Tran, T. und Santoli, D. (1999): Biodistribution of human MHC non-restricted TALL-104 killer cells in healthy and tumor bearing mice, *Int J Oncol* 14 [2], Seite 245-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9917498

Cesano, A.; Visonneau, S.; Wolfe, J. H.; Jeglum, K. A.; Fernandez, J.; Gillio, A.; O'Reilly, R. J. und Santoli, D. (1997b): Toxicological and immunological evaluation of the MHC-non-restricted cytotoxic T cell line TALL-104, *Cancer Immunol Immunother* 44 [3], Seite 125-36.

Challita-Eid, P. M.; Abboud, C. N.; Morrison, S. L.; Penichet, M. L.; Rosell, K. E.; Poles, T.; Hilchey, S. P.; Planelles, V. und Rosenblatt, J. D. (1998): A RANTES-antibody fusion protein retains antigen specificity and chemokine function, *J Immunol* 161 [7], Seite 3729-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759898

Chaudhary, V. K.; Queen, C.; Junghans, R. P.; Waldmann, T. A.; FitzGerald, D. J. und Pastan, I. (1989): A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to Pseudomonas exotoxin, *Nature* 339 [6223], Seite 394-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2498664

Chen, C. J.; Li, L. J.; Maruya, A. und Shively, J. E. (1995): In vitro and in vivo footprint analysis of the promoter of carcinoembryonic antigen in colon carcinoma cells: effects of interferon gamma treatment, *Cancer Res* 55 [17], Seite 3873-82.

Chen, W. S.; Kitson, R. P. und Goldfarb, R. H. (2002): Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1), *In Vivo* 16 [6], Seite 439-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12494887

Chen, Y. T.; Scanlan, M. J.; Sahin, U.; Tureci, O.; Gure, A. O.; Tsang, S.; Williamson, B.; Stockert, E.; Pfreundschuh, M. und Old, L. J. (1997): A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [5], Seite 1914-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=9050879

Chiesa, M. D.; Vitale, M.; Carlomagno, S.; Ferlazzo, G.; Moretta, L. und Moretta, A. (2003): The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors, *Eur J Immunol* 33 [6], Seite 1657-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12778484

Choo, A. B.; Dunn, R. D.; Broady, K. W. und Raison, R. L. (2002): Soluble expression of a functional recombinant cytolytic immunotoxin in insect cells, *Protein Expr Purif* 24 [3], Seite 338-47. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.idealibrary.com/links/citation/1046-5928/24/338>

- Chothia, C. und Lesk, A. M. (1987): Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, *J Mol Biol* 196 [4], Seite 901-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3681981
- Chothia, C.; Lesk, A. M.; Tramontano, A.; Levitt, M.; Smith-Gill, S. J.; Air, G.; Sheriff, S.; Padlan, E. A.; Davies, D.; Tulip, W. R. und et al. (1989): Conformations of immunoglobulin hypervariable regions, *Nature* 342 [6252], Seite 877-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2687698
- Chuang, S. S.; Kim, M. H.; Johnson, L. A.; Albertsson, P.; Kitson, R. P.; Nannmark, U.; Goldfarb, R. H. und Mathew, P. A. (2000): 2B4 stimulation of YT cells induces natural killer cell cytolytic function and invasiveness, *Immunology* 100 [3], Seite 378-83.
- Chuang, S. S.; Kumaresan, P. R. und Mathew, P. A. (2001): 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways, *J Immunol* 167 [11], Seite 6210-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/167/11/6210>
- Chung, S.; Wucherpennig, K. W.; Friedman, S. M.; Hafler, D. A. und Strominger, J. L. (1994): Functional three-domain single-chain T-cell receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 [26], Seite 12654-8.
- Chung, Y. S.; Yamashita, Y.; Kato, Y.; Nakata, B.; Sawada, T. und Sowa, M. (1996): Prognostic significance of T antigen expression in patients with gastric carcinoma, *Cancer* 77 [9], Seite 1768-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8646672
- Clark, M. R. (1997): IgG effector mechanisms, *Chem Immunol* 65, Seite 88-110. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9018874
- Collins, S. J.; Ruscetti, F. W.; Gallagher, R. E. und Gallo, R. C. (1978): Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 [5], Seite 2458-62.
- Collins, S. J.; Ruscetti, F. W.; Gallagher, R. E. und Gallo, R. C. (1979): Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide, *J Exp Med* 149 [4], Seite 969-74.
- Condra, J. H.; Sardana, V. V.; Tomassini, J. E.; Schlabach, A. J.; Davies, M. E.; Lineberger, D. W.; Graham, D. J.; Gotlib, L. und Colonno, R. J. (1990): Bacterial expression of antibody fragments that block human rhinovirus infection of cultured cells, *J Biol Chem* 265 [4], Seite 2292-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2153680
- Cordon Cardo, C.; Fuks, Z.; Drobnjak, M.; Moreno, C.; Eisenbach, L. und Feldman, M. (1991): Expression of HLA-A,B,C antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas, *Cancer Res* 51 [23 Pt 1], Seite 6372-80.
- Cornil, I.; Kerbel, R. S. und Dennis, J. W. (1990): Tumor cell surface beta 1-4-linked galactose binds to lectin(s) on microvascular endothelial cells and contributes to organ colonization, *J Cell Biol* 111 [2], Seite 773-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2116422
- Correa, M. R.; Ochoa, A. C.; Ghosh, P.; Mizoguchi, H.; Harvey, L. und Longo, D. L. (1997): Sequential development of structural and functional alterations in T cells from tumor-bearing mice, *J Immunol* 158 [11], Seite 5292-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi-bin/Retreiver.cgi/v158n11/5292/5292-abs-frame.html>
- Cosman, D.; Mullberg, J.; Sutherland, C. L.; Chin, W.; Armitage, R.; Fanslow, W.; Kubin, M. und Chalupny, N. J. (2001): ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor, *Immunity* 14 [2], Seite 123-33. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=11239445

Daly, T.; Royal, R. E.; Kershaw, M. H.; Treisman, J.; Wang, G.; Li, W.; Herlyn, D.; Eshhar, Z. und Hwu, P. (2000): Recognition of human colon cancer by T cells transduced with a chimeric receptor gene, *Cancer Gene Ther* 7 [2], Seite 284-91.

Davis, G. T.; Bedzyk, W. D.; Voss, E. W. und Jacobs, T. W. (1991): Single chain antibody (SCA) encoding genes: one-step construction and expression in eukaryotic cells, *Biotechnology (N Y)* 9 [2], Seite 165-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1367186

Deaglio, S.; Zubiaur, M.; Gregorini, A.; Bottarel, F.; Ausiello, C. M.; Dianzani, U.; Sancho, J. und Malavasi, F. (2002): Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells, *Blood* 99 [7], Seite 2490-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.bloodjournal.org/cgi/content/abstract/99/7/2490>

Degreve, B.; De Clercq, E. und Balzarini, J. (1999): Bystander effect of purine nucleoside analogues in HSV-1 tk suicide gene therapy is superior to that of pyrimidine nucleoside analogues, *Gene Ther* 6 [2], Seite 162-70.

Deng, S. J.; MacKenzie, C. R.; Sadowska, J.; Michniewicz, J.; Young, N. M.; Bundle, D. R. und Narang, S. A. (1994): Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display, *J Biol Chem* 269 [13], Seite 9533-8.

Djeu, J. Y.; Jiang, K. und Wei, S. (2002): A view to a kill: signals triggering cytotoxicity, *Clin Cancer Res* 8 [3], Seite 636-40. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/8/3/636>

Duenas, M.; Vazquez, J.; Ayala, M.; Soderlind, E.; Ohlin, M.; Perez, L.; Borrebaeck, C. A. und Gavilondo, J. V. (1994): Intra- and extracellular expression of an scFv antibody fragment in *E. coli*: effect of bacterial strains and pathway engineering using GroES/L chaperonins, *Biotechniques* 16 [3], Seite 476-7, 480-3.

Dunn, G. P.; Bruce, A. T.; Ikeda, H.; Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2002): Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape, *Nat Immunol* 3 [11], Seite 991-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12407406

Dutcher, J. (2002): Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma, *Oncology (Huntingt)* 16 [11 Suppl 13], Seite 4-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12469934

Ebert, O.; Finke, S.; Salahi, A.; Herrmann, M.; Trojanek, B.; Lefterova, P.; Wagner, E.; Kircheis, R.; Huhn, D.; Schriever, F. und Schmidt-Wolf, I. G. (1997): Lymphocyte apoptosis: induction by gene transfer techniques, *Gene Ther* 4 [4], Seite 296-302.

Eischen, C. M.; Woo, D.; Roussel, M. F. und Cleveland, J. L. (2001): Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis, *Mol Cell Biol* 21 [15], Seite 5063-70. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://mcb.asm.org/cgi/content/full/21/15/5063>

Engels, B.; Cam, H.; Schuler, T.; Indraccolo, S.; Gladow, M.; Baum, C.; Blankenstein, T. und Uckert, W. (2003): Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes, *Hum Gene Ther* 14 [12], Seite 1155-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12908967

Eshhar, Z. (1997): Tumor-specific T-bodies: towards clinical application, *Cancer Immunol Immunother* 45 [3-4], Seite 131-6.

Eshhar, Z.; Bach, N.; Fitzer-Attas, C. J.; Gross, G.; Lustgarten, J.; Waks, T. und Schindler, D. G. (1996): The T-body approach: potential for cancer immunotherapy, *Springer Semin Immunopathol* 18 [2], Seite 199-209.

- Eshhar, Z.; Waks, T.; Bendavid, A. und Schindler, D. G. (2001): Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells, *J Immunol Methods* 248 [1-2], Seite 67-76.
- Eshhar, Z.; Waks, T.; Gross, G. und Schindler, D. G. (1993): Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [2], Seite 720-4.
- Farson, D.; McGuinness, R.; Dull, T.; Limoli, K.; Lazar, R.; Jalali, S.; Reddy, S.; Pennathur-Das, R.; Broad, D. und Finer, M. (1999): Large-scale manufacturing of safe and efficient retrovirus packaging lines for use in immunotherapy protocols, *J Gene Med* 1 [3], Seite 195-209.
- Feng, Y. Q.; Lorincz, M. C.; Fiering, S.; Grealley, J. M. und Bouhassira, E. E. (2001): Position effects are influenced by the orientation of a transgene with respect to flanking chromatin, *Mol Cell Biol* 21 [1], Seite 298-309. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://mcb.asm.org/cgi/content/full/21/1/298>
- Ferlazzo, G.; Spaggiari, G. M.; Semino, C.; Melioli, G. und Moretta, L. (2000): Engagement of CD33 surface molecules prevents the generation of dendritic cells from both monocytes and CD34+ myeloid precursors, *Eur J Immunol* 30 [3], Seite 827-33.
- Fernandez, L. A. und de Lorenzo, V. (2001): Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway, *Mol Microbiol* 40 [2], Seite 332-46.
- Ferrara, N. (1996): Natural killer cells, adhesion and tumor angiogenesis, *Nat Med* 2 [9], Seite 971-2. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8782449
- Finer, M. H.; Dull, T. J.; Qin, L.; Farson, D. und Roberts, M. R. (1994): kat: a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes, *Blood* 83 [1], Seite 43-50.
- Finke, J.; Ferrone, S.; Frey, A.; Mufson, A. und Ochoa, A. (1999): Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors, *Immunol Today* 20 [4], Seite 158-60. 00001435 00001435. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.biomednet.com/library/abstract/IT.imto0499_01675699_v0020i04_00001435
- Fitzer Attas, C. J.; Schindler, D. G.; Waks, T. und Eshhar, Z. (1997): Direct T cell activation by chimeric single chain Fv-Syk promotes Syk-Cbl association and Cbl phosphorylation, *J Biol Chem* 272 [13], Seite 8551-7.
- Fitzer Attas, C. J.; Schindler, D. G.; Waks, T. und Eshhar, Z. (1998): Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation, *J Immunol* 160 [1], Seite 145-54.
- Fox, B. A.; Spiess, P. J.; Kasid, A.; Puri, R.; Mule, J. J.; Weber, J. S. und Rosenberg, S. A. (1990): In vitro and in vivo antitumor properties of a T-cell clone generated from murine tumor-infiltrating lymphocytes, *J Biol Response Mod* 9 [5], Seite 499-511.
- Foy, S. P. und Matsuuchi, L. (2001): Association of B lymphocyte antigen receptor polypeptides with multiple chaperone proteins, *Immunol Lett* 78 [3], Seite 149-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11578689
- Frangsmyr, L.; Baranov, V. und Hammarstrom, S. (1999): Four carcinoembryonic antigen subfamily members, CEA, NCA, BGP and CGM2, selectively expressed in the normal human colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat, *Tumour Biol* 20 [5], Seite 277-92.
- Freeman, S. D.; Kelm, S.; Barber, E. K. und Crocker, P. R. (1995): Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules, *Blood* 85 [8], Seite 2005-12.
- Freund, C.; Ross, A.; Guth, B.; Pluckthun, A. und Holak, T. A. (1993): Characterization of the linker peptide of the single-chain Fv fragment of an antibody by NMR spectroscopy, *FEBS Lett* 320 [2], Seite 97-100. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8458438

- Gahmberg, C. G.; Valmu, L.; Fagerholm, S.; Kotovuori, P.; Ihanus, E.; Tian, L. und Pessa-Morikawa, T. (1998): Leukocyte integrins and inflammation, *Cell Mol Life Sci* 54 [6], Seite 549-55.
- Galandrini, R.; Palmieri, G.; Piccoli, M.; Frati, L. und Santoni, A. (1999): Role for the Rac1 exchange factor Vav in the signaling pathways leading to NK cell cytotoxicity, *J Immunol* 162 [6], Seite 3148-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/v162n6/3148/3148-abs-frame.html>
- Gao, G. und Goldfarb, M. (1995): Heparin can activate a receptor tyrosine kinase, *Embo J* 14 [10], Seite 2183-90.
- Gao, L.; Yang, T. H.; Tourdot, S.; Sadovnikova, E.; Hasserjian, R. und Stauss, H. J. (1999): Allo-major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes engraft in bone marrow transplant recipients without causing graft-versus-host disease, *Blood* 94 [9], Seite 2999-3006. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.bloodjournal.org/cgi/content/abstract/94/9/2999>
- Garcia-Lora, A.; Algarra, I. und Garrido, F. (2003): MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape, *J Cell Physiol* 195 [3], Seite 346-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12704644
- Garrick, D.; Sutherland, H.; Robertson, G. und Whitelaw, E. (1996): Variegated expression of a globin transgene correlates with chromatin accessibility but not methylation status, *Nucleic Acids Res* 24 [24], Seite 4902-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.oup.co.uk/nar/Volume_24/Issue_24/6c0156_gml.abs.html
- Garrido, F.; Cabrera, T.; Lopez Nevot, M. A. und Ruiz Cabello, F. (1995): HLA class I antigens in human tumors, *Adv Cancer Res*, Seite 67155-95.
- Gastman, B. R.; Atarshi, Y.; Reichert, T. E.; Saito, T.; Balkir, L.; Rabinowich, H. und Whiteside, T. L. (1999): Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes, *Cancer Res* 59 [20], Seite 5356-64.
- George, T.; Yu, Y. Y.; Liu, J.; Davenport, C.; Lemieux, S.; Stoneman, E.; Mathew, P. A.; Kumar, V. und Bennett, M. (1997): Alloreognition by murine natural killer cells: lysis of T-lymphoblasts and rejection of bone-marrow grafts, *Immunol Rev* 155, Seite 29-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9059880
- Ghosh, P.; Komschlies, K. L.; Cippitelli, M.; Longo, D. L.; Subleski, J.; Ye, J.; Sica, A.; Young, H. A.; Wilttrout, R. H. und Ochoa, A. C. (1995): Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth, *J Natl Cancer Inst* 87 [19], Seite 1478-83.
- Giralt, S. A. und Kolb, H. J. (1996): Donor lymphocyte infusions, *Curr Opin Oncol* 8 [2], Seite 96-102.
- Gismondi, A.; Morrone, S.; Humphries, M. J.; Piccoli, M.; Frati, L. und Santoni, A. (1991): Human natural killer cells express VLA-4 and VLA-5, which mediate their adhesion to fibronectin, *J Immunol* 146 [1], Seite 384-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1701798
- Gladow, M.; Uckert, W. und Blankenstein, T. (2004): Dual T cell receptor T cells with two defined specificities mediate tumor suppression via both receptors, *Eur J Immunol* 34 [7], Seite 1882-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15214036
- Glockshuber, R.; Malia, M.; Pfitzinger, I. und Pluckthun, A. (1990): A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments, *Biochemistry* 29 [6], Seite 1362-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2110478
- Goldberger, A.; Middleton, K. A. und Newman, P. J. (1994): Changes in expression of the cell adhesion molecule PECAM-1 (CD31) during differentiation of human leukemic cell lines, *Tissue Antigens* 44 [5], Seite 285-93.

- Gorochov, G.; Lustgarten, J.; Waks, T.; Gross, G. und Eshhar, Z. (1992): Functional assembly of chimeric T-cell receptor chains, *Int J Cancer Suppl* 7, Seite 53-7.
- Goverman, J.; Gomez, S. M.; Segesman, K. D.; Hunkapiller, T.; Laug, W. E. und Hood, L. (1990): Chimeric immunoglobulin-T cell receptor proteins form functional receptors: implications for T cell receptor complex formation and activation, *Cell* 60 [6], Seite 929-39.
- Gowans, J. L. und Uhr, J. W. (1966): The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat, *J Exp Med* 124 [5], Seite 1017-30.
- Gratama, J. W.; Zea, A. H.; Bolhuis, R. L. und Ochoa, A. C. (1999): Restoration of expression of signal-transduction molecules in lymphocytes from patients with metastatic renal cell cancer after combination immunotherapy, *Cancer Immunol Immunother* 48 [5], Seite 263-9.
- Griep, R. A.; van Twisk, C.; Kerschbaumer, R. J.; Harper, K.; Torrance, L.; Himmler, G.; van der Wolf, J. M. und Schots, A. (1999): pSKAP/S: An expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins, *Protein Expr Purif* 16 [1], Seite 63-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.idealibrary.com/links/citation/1046-5928/16/63>
- Griffioen, A. W.; Coenen, M. J.; Damen, C. A.; Hellwig, S. M.; van Weering, D. H.; Vooys, W.; Blijham, G. H. und Groenewegen, G. (1997): CD44 is involved in tumor angiogenesis; an activation antigen on human endothelial cells, *Blood* 90 [3], Seite 1150-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/90/3/1150>
- Griffioen, A. W.; Damen, C. A.; Blijham, G. H. und Groenewegen, G. (1996): Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium, *Blood* 88 [2], Seite 667-73.
- Gross, G.; Waks, T. und Eshhar, Z. (1989): Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [24], Seite 10024-8.
- Gubler, U. und Hoffman, B. J. (1983): A simple and very efficient method for generating cDNA libraries, *Gene* 25 [2-3], Seite 263-9.
- Gumperz, J. E.; Barber, L. D.; Valiante, N. M.; Percival, L.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L. und Parham, P. (1997): Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor, *J Immunol* 158 [11], Seite 5237-41.
- Gussow, D. und Seemann, G. (1991): Humanization of monoclonal antibodies, *Methods Enzymol* 203, Seite 99-121.
- Hacein-Bey-Abina, S.; Von Kalle, C.; Schmidt, M.; McCormack, M. P.; Wulffraat, N.; Leboulch, P.; Lim, A.; Osborne, C. S.; Pawliuk, R.; Morillon, E.; Sorensen, R.; Forster, A.; Fraser, P.; Cohen, J. I.; de Saint Basile, G.; Alexander, I.; Wintergerst, U.; Frebourg, T.; Aurias, A.; Stoppa-Lyonnet, D.; Romana, S.; Radford-Weiss, I.; Gross, F.; Valensi, F.; Delabesse, E.; Macintyre, E.; Sigaux, F.; Soulier, J.; Leiva, L. E.; Wissler, M.; Prinz, C.; Rabbitts, T. H.; Le Deist, F.; Fischer, A. und Cavazzana-Calvo, M. (2003): LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1, *Science* 302 [5644], Seite 415-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14564000
- Hammarstrom, S. (1999): The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues, *Semin Cancer Biol* 9 [2], Seite 67-81. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.idealibrary.com/links/citation/1044-579X/9/67>
- Hanahan, D. (1985): *DNA Cloning* 1, Glover, D., IRL Press Ltd., London.
- Hanson, H. L.; Donermeyer, D. L.; Ikeda, H.; White, J. M.; Shankaran, V.; Old, L. J.; Shiku, H.; Schreiber, R. D. und Allen, P. M. (2000): Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy, *Immunity* 13 [2], Seite 265-76. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.immunity.com/cgi/content/full/13/2/265>
- Hansson, M.; Jonsson, S.; Persson, A. M.; Calafat, J.; Tapper, H. und Olsson, I. (2003): Targeting proteins to secretory lysosomes of natural killer cells as a principle for immunoregulation, *Mol Immunol*

40 [6], Seite 363-72. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14522017

Haynes, N. M.; Smyth, M. J.; Kershaw, M. H.; Trapani, J. A. und Darcy, P. K. (1999): Fas-ligand-mediated lysis of erbB-2-expressing tumour cells by redirected cytotoxic T lymphocytes, *Cancer Immunol Immunother* 47 [5], Seite 278-86.

Haynes, N. M.; Snook, M. B.; Trapani, J. A.; Cerruti, L.; Jane, S. M.; Smyth, M. J. und Darcy, P. K. (2001): Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma, *J Immunol* 166 [1], Seite 182-7. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1123291

Haynes, N. M.; Trapani, J. A.; Teng, M. W.; Jackson, J. T.; Cerruti, L.; Jane, S. M.; Kershaw, M. H.; Smyth, M. J. und Darcy, P. K. (2002a): Rejection of syngeneic colon carcinoma by CTLs expressing single-chain antibody receptors codelivering CD28 costimulation, *J Immunol* 169 [10], Seite 5780-6. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12421958

Haynes, N. M.; Trapani, J. A.; Teng, M. W.; Jackson, J. T.; Cerruti, L.; Jane, S. M.; Kershaw, M. H.; Smyth, M. J. und Darcy, P. K. (2002b): Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors, *Blood* 100 [9], Seite 3155-63. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12384413

Heiskala, M. K.; Patarroyo, M. und Timonen, T. T. (1990): Participation of CD11a-c/CD18 and RGD-recognizing adhesion molecules in the binding of LGL to fibroblasts. Evidence for the role of CD11a in the fibroblast-mediated inactivation of NK cells, *Scand J Immunol* 32 [2], Seite 137-47.

Herberman, R. B.; Holden, H. T.; Ting, C. C.; Lavrin, D. L. und Kirchner, H. (1976): Cell-mediated immunity to leukemia virus- and tumor-associated antigens in mice, *Cancer Res* 36 [2 pt 2], Seite 615-21. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=56223

Hertel, A.; Baum, R. P.; Lorenz, M.; Baew Christow, T.; Encke, A. und Hor, G. (1990): Immunoscintigraphy using a technetium-99m labelled monoclonal anti-CEA antibody in the follow-up of colorectal cancer and other tumours producing CEA, *Br J Cancer Suppl* 6, Seite 1034-6.

Hinnen, A.; Hicks, J. B. und Fink, G. R. (1978): Transformation of yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 [4], Seite 1929-33. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=347451

Hombach, A.; Heuser, C.; Gerken, M.; Fischer, B.; Lewalter, K.; Diehl, V.; Pohl, C. und Abken, H. (2000a): T cell activation by recombinant FcepsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition, *Gene Ther* 7 [12], Seite 1067-75.

Hombach, A.; Heuser, C.; Marquardt, T.; Wieczarkowicz, A.; Groneck, V.; Pohl, C. und Abken, H. (2001a): Cd4(+) t cells engrafted with a recombinant immunoreceptor efficiently lyse target cells in a mhc antigen- and fas-independent fashion, *J Immunol* 167 [2], Seite 1090-6. URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/167/2/1090>

Hombach, A.; Heuser, C.; Sircar, R.; Tillmann, T.; Diehl, V.; Kruis, W.; Pohl, C. und Abken, H. (1997): T cell targeting of TAG72+ tumor cells by a chimeric receptor with antibody-like specificity for a carbohydrate epitope, *Gastroenterology* 113 [4], Seite 1163-70.

Hombach, A.; Heuser, C.; Sircar, R.; Tillmann, T.; Diehl, V.; Pohl, C. und Abken, H. (1998a): An anti-CD30 chimeric receptor that mediates CD3-zeta-independent T-cell activation against Hodgkin's lymphoma cells in the presence of soluble CD30, *Cancer Res* 58 [6], Seite 1116-9.

- Hombach, A.; Koch, D.; Sircar, R.; Heuser, C.; Diehl, V.; Kruis, W.; Pohl, C. und Abken, H. (1999): A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA, *Gene Ther* 6 [2], Seite 300-4.
- Hombach, A.; Muche, J. M.; Gerken, M.; Gellrich, S.; Heuser, C.; Pohl, C.; Sterry, W. und Abken, H. (2001b): T cells engrafted with a recombinant anti-CD30 receptor target autologous CD30(+) cutaneous lymphoma cells, *Gene Ther* 8 [11], Seite 891-5.
- Hombach, A.; Schneider, C.; Sent, D.; Koch, D.; Willemsen, R. A.; Diehl, V.; Kruis, W.; Bolhuis, R. L.; Pohl, C. und Abken, H. (2000b): An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells, *Int J Cancer* 88 [1], Seite 115-20.
- Hombach, A.; Sent, D.; Schneider, C.; Heuser, C.; Koch, D.; Pohl, C.; Seliger, B. und Abken, H. (2001c): T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis, *Cancer Res* 61 [5], Seite 1976-82.
- Hombach, A.; Sircar, R.; Heuser, C.; Tillmann, T.; Diehl, V.; Kruis, W.; Pohl, C. und Abken, H. (1998b): Chimeric anti-TAG72 receptors with immunoglobulin constant Fc domains and gamma or zeta signalling chains, *Int J Mol Med* 2 [1], Seite 99-103.
- Honegger, A. und Pluckthun, A. (2001): Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool, *J Mol Biol* 309 [3], Seite 657-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11397087
- Horowitz, M. M.; Gale, R. P.; Sondel, P. M.; Goldman, J. M.; Kersey, J.; Kolb, H. J.; Rimm, A. A.; Ringden, O.; Rozman, C.; Speck, B. und et al. (1990): Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation, *Blood* 75 [3], Seite 555-62.
- Hu, J.; Kindsvogel, W.; Busby, S.; Bailey, M. C.; Shi, Y. Y. und Greenberg, P. D. (1993): An evaluation of the potential to use tumor-associated antigens as targets for antitumor T cell therapy using transgenic mice expressing a retroviral tumor antigen in normal lymphoid tissues, *J Exp Med* 177 [6], Seite 1681-90.
- Hudson, P. J. und Kortt, A. A. (1999): High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies, *J Immunol Methods* 231 [1-2], Seite 177-89.
- Huston, J. S.; McCartney, J.; Tai, M. S.; Mottola-Hartshorn, C.; Jin, D.; Warren, F.; Keck, P. und Oppermann, H. (1993): Medical applications of single-chain antibodies, *Int Rev Immunol* 10 [2-3], Seite 195-217. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8360586
- Hwu, P.; Shafer, G. E.; Treisman, J.; Schindler, D. G.; Gross, G.; Cowherd, R.; Rosenberg, S. A. und Eshhar, Z. (1993a): Lysis of ovarian cancer cells by human lymphocytes redirected with a chimeric gene composed of an antibody variable region and the Fc receptor gamma chain, *J Exp Med* 178 [1], Seite 361-6.
- Hwu, P.; Yang, J. C.; Cowherd, R.; Treisman, J.; Shafer, G. E.; Eshhar, Z. und Rosenberg, S. A. (1995): In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes, *Cancer Res* 55 [15], Seite 3369-73.
- Hwu, P.; Yannelli, J.; Kriegler, M.; Anderson, W. F.; Perez, C.; Chiang, Y.; Schwarz, S.; Cowherd, R.; Delgado, C.; Mule, J. und et al. (1993b): Functional and molecular characterization of tumor-infiltrating lymphocytes transduced with tumor necrosis factor-alpha cDNA for the gene therapy of cancer in humans, *J Immunol* 150 [9], Seite 4104-15.
- Ito, W.; Iba, Y. und Kurosawa, Y. (1993): Effects of substitutions of closely related amino acids at the contact surface in an antigen-antibody complex on thermodynamic parameters, *J Biol Chem* 268 [22], Seite 16639-47.
- Jensen, M. C.; Clarke, P.; Tan, G.; Wright, C.; Chung-Chang, W.; Clark, T. N.; Zhang, F.; Slovak, M. L.; Wu, A. M.; Forman, S. J. und Raubitschek, A. (2000): Human T lymphocyte genetic modification with naked DNA, *Mol Ther* 1 [1], Seite 49-55.

Jensen, M. C.; Cooper, L. J.; Wu, A. M.; Forman, S. J. und Raubitschek, A. (2003): Engineered CD20-specific primary human cytotoxic T lymphocytes for targeting B-cell malignancy, *Cytotherapy* 5 [2], Seite 131-8. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12745575

Jewett, A. (2001): Activation of c-Jun N-terminal kinase in the absence of NFkappaB function prior to induction of NK cell death triggered by a combination of anti-class I and anti-CD16 antibodies, *Hum Immunol* 62 [4], Seite 320-31.

Jiang, K.; Zhong, B.; Gilvary, D. L.; Corliss, B. C.; Hong-Geller, E.; Wei, S. und Djeu, J. Y. (2000): Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells, *Nat Immunol* 1 [5], Seite 419-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf%3ffile=/ni/journal/v1/n5/abs/ni1100_419.html

Jiang, Y. Z.; Kanfer, E. J.; Macdonald, D.; Cullis, J. O.; Goldman, J. M. und Barrett, A. J. (1991): Graft-versus-leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation: emergence of cytotoxic T lymphocytes reacting to host leukaemia cells, *Bone Marrow Transplant* 8 [4], Seite 253-8.

Johnson, L. A.; Goldfarb, R. H. und Mathew, P. A. (2000): Regulation of IFN-gamma production following 2B4 activation in human NK cells, *In Vivo* 14 [5], Seite 625-9.

Jost, C. R.; Kurucz, I.; Jacobus, C. M.; Titus, J. A.; George, A. J. und Segal, D. M. (1994): Mammalian expression and secretion of functional single-chain Fv molecules, *J Biol Chem* 269 [42], Seite 26267-73.

Jung, S. H.; Pastan, I. und Lee, B. (1994): Design of interchain disulfide bonds in the framework region of the Fv fragment of the monoclonal antibody B3, *Proteins* 19 [1], Seite 35-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8066084

Jurcic, J. G. (2000): Antibody therapy of acute myelogenous leukemia, *Cancer Biother Radiopharm* 15 [4], Seite 319-26.

Jurcic, J. G. (2001): Antibody therapy for residual disease in acute myelogenous leukemia, *Crit Rev Oncol Hematol* 38 [1], Seite 37-45.

Jurcic, J. G.; Larson, S. M.; Sgouros, G.; McDevitt, M. R.; Finn, R. D.; Divgi, C. R.; Ballangrud, A. M.; Hamacher, K. A.; Ma, D.; Humm, J. L.; Brechbiel, M. W.; Molinet, R. und Scheinberg, D. A. (2002): Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia, *Blood* 100 [4], Seite 1233-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/100/4/1233>

Kabat, E.A.; Wu, T.T.; Reid-Miller, M.; Perry, H.M. und Gottesman, K.S. (1987): Sequences of Proteins of Immunological Interest., 4. Auflage, US Department of Health Human Services, Washington, DC.

Kansas, G. S.; Muirhead, M. J. und Dailey, M. O. (1990): Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans, *Blood* 76 [12], Seite 2483-92.

Karre, K. (1995): Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells, *Science* 267 [5200], Seite 978-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7863341

Kataoka, T.; Schroter, M.; Hahne, M.; Schneider, P.; Irmeler, M.; Thome, M.; Froelich, C. J. und Tschoep, J. (1998): FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation, *J Immunol* 161 [8], Seite 3936-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9780161

Kato, T.; Sato, K.; Suzuki, S.; Sasakawa, H.; Kurokawa, M.; Nishioka, K. und Yamamoto, K. (1995): Mammalian expression of single chain variable region fragments dimerized by Fc regions, *Mol Biol Rep* 21 [3], Seite 141-6.

Kawata, A.; Hosokawa, M.; Sawamura, Y.; Ito, K.; Une, Y.; Shibata, T.; Uchino, J. und Kobayashi, H. (1990): Modification of lymphokine-activated killer cell accumulation into tumor sites by chemotherapy, local irradiation, or splenectomy, *Mol Biother* 2 [4], Seite 221-7.

Kawata, A.; Une, Y.; Hosokawa, M.; Wakizaka, Y.; Namieno, T.; Uchino, J. und Kobayashi, H. (1995): Adjuvant chemoimmunotherapy for hepatocellular carcinoma patients. Adriamycin, interleukin-2, and lymphokine-activated killer cells versus adriamycin alone, *Am J Clin Oncol* 18 [3], Seite 257-62.

Kazemier, B.; de Haard, H.; Boender, P.; van Gemen, B. und Hoogenboom, H. (1996): Determination of active single chain antibody concentrations in crude periplasmic fractions, *J Immunol Methods* 194 [2], Seite 201-9.

Kelly, J. M.; Darcy, P. K.; Markby, J. L.; Godfrey, D. I.; Takeda, K.; Yagita, H. und Smyth, M. J. (2002): Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection, *Nat Immunol* 3 [1], Seite 83-90.

Kershaw, M. H.; Westwood, J. A. und Hwu, P. (2002): Dual-specific T cells combine proliferation and antitumor activity, *Nat Biotechnol* 20 [12], Seite 1221-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12415288

Kershaw, M. H.; Westwood, J. A.; Zhu, Z.; Witte, L.; Libutti, S. K. und Hwu, P. (2000): Generation of gene-modified T cells reactive against the angiogenic kinase insert domain-containing receptor (KDR) found on tumor vasculature, *Hum Gene Ther* 11 [18], Seite 2445-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1119416

Khan, W. N.; Frangsmyr, L.; Teglund, S.; Israelsson, A.; Bremer, K. und Hammarstrom, S. (1992): Identification of three new genes and estimation of the size of the carcinoembryonic antigen family, *Genomics* 14 [2], Seite 384-90.

King, A.; Hiby, S. E.; Gardner, L.; Joseph, S.; Bowen, J. M.; Verma, S.; Burrows, T. D. und Loke, Y. W. (2000): Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors--a review, *Placenta* 21 Suppl A, Seite S81-5.

Kinugasa, T.; Kuroki, M.; Takeo, H.; Matsuo, Y.; Ohshima, K.; Yamashita, Y.; Shirakusa, T. und Matsuoka, Y. (1998): Expression of four CEA family antigens (CEA, NCA, BGP and CGM2) in normal and cancerous gastric epithelial cells: up-regulation of BGP and CGM2 in carcinomas, *Int J Cancer* 76 [1], Seite 148-53.

Kipriyanov, S. M.; Kupriyanova, O. A.; Little, M. und Moldenhauer, G. (1996): Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell- surface antigens by flow cytometry, *J Immunol Methods* 196 [1], Seite 51-62.

Kipriyanov, S. M.; Moldenhauer, G. und Little, M. (1997a): High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures, *J Immunol Methods* 200 [1-2], Seite 69-77.

Kipriyanov, S. M.; Moldenhauer, G.; Martin, A. C.; Kupriyanova, O. A. und Little, M. (1997b): Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity, *Protein Eng* 10 [4], Seite 445-53.

Kipriyanov, S. M.; Moldenhauer, G.; Strauss, G. und Little, M. (1998): Bispecific CD3 x CD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells, *Int J Cancer* 77 [5], Seite 763-72.

Kleber Janke, T. und Becker, W. M. (2000): Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage, *Protein Expr Purif* 19 [3], Seite 419-24.

Klingemann, H. G. und Miyagawa, B. (1996): Purging of malignant cells from blood after short ex vivo incubation with NK-92 cells, *Blood* 87 [11], Seite 4913-4.

Klingemann, H. G.; Wong, E. und Maki, G. (1996): A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood, *Biol Blood Marrow Transplant* 2 [2], Seite 68-75.

Knarr, G.; Gething, M. J.; Modrow, S. und Buchner, J. (1995): BiP binding sequences in antibodies, *J Biol Chem* 270 [46], Seite 27589-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7499221

- Knazek, R. A.; Wu, Y. W.; Aebersold, P. M. und Rosenberg, S. A. (1990): Culture of human tumor infiltrating lymphocytes in hollow fiber bioreactors, *J Immunol Methods* 127 [1], Seite 29-37.
- Koduri, R. K.; Miller, J. T. und Thammana, P. (2001): An efficient homologous recombination vector pTV(I) contains a hot spot for increased recombinant protein expression in Chinese hamster ovary cells, *Gene* 280 [1-2], Seite 87-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11738821
- Kogure, K.; Urabe, M.; Mizukami, H.; Kume, A.; Sato, Y.; Monahan, J. und Ozawa, K. (2001): Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components, *Int J Hematol* 73 [4], Seite 469-75.
- Kontermann, R. E.; Liu, Z.; Schulze, R. A.; Sommer, K. A.; Queitsch, I.; Dubel, S.; Kipriyanov, S. M.; Breitling, F. und Bautz, E. K. (1995): Characterization of the epitope recognized by a monoclonal antibody directed against the largest subunit of Drosophila RNA polymerase II, *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376 [8], Seite 473-81.
- Kossman, S. E.; Scheinberg, D. A.; Jurcic, J. G.; Jimenez, J. und Caron, P. C. (1999): A phase I trial of humanized monoclonal antibody HuM195 (anti-CD33) with low-dose interleukin 2 in acute myelogenous leukemia, *Clin Cancer Res* 5 [10], Seite 2748-55.
- Kretzschmar, T.; Aoustin, L.; Zingel, O.; Marangi, M.; Vonach, B.; Towbin, H. und Geiser, M. (1996): High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies, *J Immunol Methods* 195 [1-2], Seite 93-101.
- Krop-Watorek, A.; Oikawa, S.; Oyama, Y. und Nakazato, H. (1998): Oligomerization of N-terminal domain of carcinoembryonic antigen (CEA) expressed in Escherichia coli, *Biochem Biophys Res Commun* 242 [1], Seite 79-83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.idealibrary.com/links/citation/0006-291X/242/79>
- Kubin, M.; Cassiano, L.; Chalupny, J.; Chin, W.; Cosman, D.; Fanslow, W.; Mullberg, J.; Rousseau, A. M.; Ulrich, D. und Armitage, R. (2001): ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells, *Eur J Immunol* 31 [5], Seite 1428-37.
- Kuroki, M.; Arakawa, F.; Yamamoto, H.; Shimura, H.; Ikehara, Y. und Matsuoka, Y. (1988): Active production and membrane anchoring of carcinoembryonic antigen observed in normal colon mucosa, *Cancer Lett* 43 [1-2], Seite 151-7.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [259], Seite 680-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063
- Lal, S.; Lauer, U. M.; Niethammer, D.; Beck, J. F. und Schlegel, P. G. (2000): Suicide genes: past, present and future perspectives, *Immunol Today* 21 [1], Seite 48-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.biomednet.com/library/abstract/IT.etd00202_01675699_v0021i01_00001550
- Lang, S.; Vujanovic, N. L.; Wollenberg, B. und Whiteside, T. L. (1998): Absence of B7.1-CD28/CTLA-4-mediated co-stimulation in human NK cells, *Eur J Immunol* 28 [3], Seite 780-6.
- Lanier, L. L.; Spits, H. und Phillips, J. H. (1992): The developmental relationship between NK cells and T cells, *Immunol Today* 13 [10], Seite 392-5.
- Leitzgen, K.; Knittler, M. R. und Haas, I. G. (1997): Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. A model for oligomerization-dependent subunit folding, *J Biol Chem* 272 [5], Seite 3117-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9006964
- Leong, S. P.; Zhou, Y. M.; Granberry, M. E.; Wang, T. F.; Grogan, T. M.; Spier, C.; White, R.; Mehta, A. und Lin, A. Y. (1995): Generation of cytotoxic effector cells against human melanoma, *Cancer Immunol Immunother* 40 [6], Seite 397-409.

- Levin, L. V. und Griffin, T. W. (1991): Specific adhesion of carcinoembryonic antigen-bearing colorectal cancer cells to immobilized carcinoembryonic antigen, *Cancer Lett* 60 [2], Seite 143-52.
- Lewko, W. M.; Hall, P. B. und Oldham, R. K. (2000): Growth of tumor-derived activated T cells for the treatment of advanced cancer, *Cancer Biother Radiopharm* 15 [4], Seite 357-66.
- Li, J. und Baker, M. D. (2000): Mechanisms involved in targeted gene replacement in mammalian cells, *Genetics* 156 [2], Seite 809-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11014826
- Li, Q. S.; Tanaka, S.; Kisenge, R. R.; Toyoda, H.; Azuma, E. und Komada, Y. (2000): Activation-induced T cell death occurs at G1A phase of the cell cycle, *Eur J Immunol* 30 [11], Seite 3329-37.
- Li, R.; Xie, J.; Kantor, C.; Koistinen, V.; Altieri, D. C.; Nortamo, P. und Gahmberg, C. G. (1995): A peptide derived from the intercellular adhesion molecule-2 regulates the avidity of the leukocyte integrins CD11b/CD18 and CD11c/CD18, *J Cell Biol* 129 [4], Seite 1143-53.
- Liberatore, C.; Capanni, M.; Albi, N.; Volpi, I.; Urbani, E.; Ruggeri, L.; Mencarelli, A.; Grignani, F. und Velardi, A. (1999): Natural killer cell-mediated lysis of autologous cells modified by gene therapy, *J Exp Med* 189 [12], Seite 1855-62. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jem.org/cgi/content/full/189/12/1855>
- Lin Chua, H. und Brahmi, Z. (2002): Expression of p58.2 or CD94/NKG2A inhibitory receptors in an NK-like cell line, YTINDY, leads to HLA Class I-mediated inhibition of cytotoxicity in the p58.2- but not the CD94/NKG2A-expressing transfectant, *Cell Immunol* 219 [1], Seite 57-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12473268
- Lipshy, K. A.; Kostuchenko, P. J.; Hamad, G. G.; Bland, C. E.; Barrett, S. K. und Bear, H. D. (1997): Sensitizing T-lymphocytes for adoptive immunotherapy by vaccination with wild-type or cytokine gene-transduced melanoma, *Ann Surg Oncol* 4 [4], Seite 334-41.
- Lister, J.; Rybka, W. B.; Donnenberg, A. D.; deMagalhaes Silverman, M.; Pincus, S. M.; Bloom, E. J.; Elder, E. M.; Ball, E. D. und Whiteside, T. L. (1995): Autologous peripheral blood stem cell transplantation and adoptive immunotherapy with activated natural killer cells in the immediate posttransplant period, *Clin Cancer Res* 1 [6], Seite 607-14.
- Liu, J. H.; Wei, S.; Blanchard, D. K. und Djieu, J. Y. (1994): Restoration of lytic function in a human natural killer cell line by gene transfection, *Cell Immunol* 156 [1], Seite 24-35.
- Ljunggren, H. G. und Karre, K. (1990): In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition, *Immunol Today* 11 [7], Seite 237-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2201309
- Llano, M.; Lee, N.; Navarro, F.; Garcia, P.; Albar, J. P.; Geraghty, D. E. und Lopez-Botet, M. (1998): HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer, *Eur J Immunol* 28 [9], Seite 2854-63.
- Lodish, H. F. (1991): Recognition of complex oligosaccharides by the multi-subunit asialoglycoprotein receptor, *Trends Biochem Sci* 16 [10], Seite 374-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1785139
- Lopez Botet, M.; Bellon, T.; Llano, M.; Navarro, F.; Garcia, P. und de Miguel, M. (2000): Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules, *Hum Immunol* 61 [1], Seite 7-17.
- Love, P. E.; Lee, J. und Shores, E. W. (2000): Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection, *J Immunol* 165 [6], Seite 3080-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/v165n6/3080/3080-abs-frame.html>
- Love, P. E. und Shores, E. W. (2000): ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go?, *Immunity* 12 [6], Seite 591-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.immunity.com/cgi/content/full/12/6/591>

Lowdell, M. W.; Craston, R.; Samuel, D.; Wood, M. E.; O'Neill, E.; Saha, V. und Prentice, H. G. (2002): Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells, *Br J Haematol* 117 [4], Seite 821-7.

Lowdell, M. W.; Shamim, F.; Hamon, M.; Macdonald, I. D. und Prentice, H. G. (1995): VLA-6 (CDw49f) is an important adhesion molecule in NK cell-mediated cytotoxicity following autologous or allogeneic bone marrow transplantation, *Exp Hematol* 23 [14], Seite 1530-4.

Luo, D.; Vermijlen, D.; Vanderkerken, K.; Kuppen, P. J.; Seynaeve, C.; Eddouks, M.; Baekeland, M. und Wisse, E. (1999): Involvement of LFA-1 in hepatic NK cell (pit cell)-mediated cytolysis and apoptosis of colon carcinoma cells, *J Hepatol* 31 [1], Seite 110-6.

MacCallum, R. M.; Martin, A. C. und Thornton, J. M. (1996): Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography, *J Mol Biol* 262 [5], Seite 732-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8876650

Maenpaa, A.; Jaaskelainen, J.; Carpen, O.; Patarroyo, M. und Timonen, T. (1993): Expression of integrins and other adhesion molecules on NK cells; impact of IL-2 on short- and long-term cultures, *Int J Cancer* 53 [5], Seite 850-5.

Maki, G.; Klingemann, H. G.; Martinson, J. A. und Tam, Y. K. (2001): Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92, *J Hematother Stem Cell Res* 10 [3], Seite 369-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11454312

Maki, G.; Tam, Y. K.; Berkahn, L. und Klingemann, H. G. (2003): Ex vivo purging with NK-92 prior to autografting for chronic myelogenous leukemia, *Bone Marrow Transplant* 31 [12], Seite 1119-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12796791

Malnati, M. S.; Peruzzi, M.; Parker, K. C.; Biddison, W. E.; Ciccone, E.; Moretta, A. und Long, E. O. (1995): Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones, *Science* 267 [5200], Seite 1016-8.

Malone, C. C.; Schiltz, P. M.; Mackintosh, A. D.; Beutel, L. D.; Heinemann, F. S. und Dillman, R. O. (2001): Characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes expanded in hollow-fiber bioreactors for immunotherapy of cancer, *Cancer Biother Radiopharm* 16 [5], Seite 381-90.

Marks, J. D.; Griffiths, A. D.; Malmqvist, M.; Clackson, T. P.; Bye, J. M. und Winter, G. (1992): Bypassing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling, *Biotechnology* 10 [7], Seite 779-83.

Martineau, P.; Jones, P. und Winter, G. (1998): Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm, *J Mol Biol* 280 [1], Seite 117-27. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.idealibrary.com/links/citation/0022-2836/280/117>

Martin-Fontecha, A.; Assarsson, E.; Carbone, E.; Karre, K. und Ljunggren, H. G. (1999): Triggering of murine NK cells by CD40 and CD86 (B7-2), *J Immunol* 162 [10], Seite 5910-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10229827

Matsuda, M.; Salazar, F.; Petersson, M.; Masucci, G.; Hansson, J.; Pisa, P.; Zhang, Q. J.; Masucci, M. G. und Kiessling, R. (1994): Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression, *J Exp Med* 180 [6], Seite 2371-6.

Matsuoka, Y.; Matsuo, Y.; Okamoto, N.; Kuroki, M. und Ikehara, Y. (1991): Highly effective extraction of carcinoembryonic antigen with phosphatidylinositol-specific phospholipase C, *Tumour Biol* 12 [2], Seite 91-8.

Matthews, D. C. (1998): Immunotherapy in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome, *Leukemia* 12 Suppl 1, Seite S33-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9777893

- Matthey, B.; Engert, A.; Klimka, A.; Diehl, V. und Barth, S. (1999): A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of Pseudomonas exotoxin-based fusion proteins, *Gene* 229 [1-2], Seite 145-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.elsevier.com:80/cgi-bin/cas/tree/store/gene/cas_sub/browse/browse.cgi%3fyear=1999&volume=229&issue=1-2&aid=11768
- Mattis, A. E.; Bernhardt, G.; Lipp, M. und Forster, R. (1997): Analyzing cytotoxic T lymphocyte activity: a simple and reliable flow cytometry-based assay, *J Immunol Methods* 204 [2], Seite 135-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9212830
- McGuinness, R. P.; Ge, Y.; Patel, S. D.; Kashmiri, S. V.; Lee, H. S.; Hand, P. H.; Schlom, J.; Finer, M. H. und McArthur, J. G. (1999): Anti-tumor activity of human T cells expressing the CC49-zeta chimeric immune receptor, *Hum Gene Ther* 10 [2], Seite 165-73.
- McKnight, R. A.; Wall, R. J. und Hennighausen, L. (1995): Expression of genomic and cDNA transgenes after co-integration in transgenic mice, *Transgenic Res* 4 [1], Seite 39-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7881461
- McLaughlin, F.; Hayes, B. P.; Horgan, C. M.; Beesley, J. E.; Campbell, C. J. und Randi, A. M. (1998): Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-1beta down-regulate intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 expression on the endothelium, *Cell Adhes Commun* 6 [5], Seite 381-400.
- Mellado, M.; Rodriguez-Frade, J. M.; Manes, S. und Martinez, A. C. (2001): Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation, *Annu Rev Immunol* 19, Seite 397-421. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11244042
- Mesnil, M. und Yamasaki, H. (2000): Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication, *Cancer Res* 60 [15], Seite 3989-99.
- Milenic, D. E.; Brady, E. D. und Brechbiel, M. W. (2004): Antibody-targeted radiation cancer therapy, *Nat Rev Drug Discov* 3 [6], Seite 488-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15173838
- Miltenyi, S.; Muller, W.; Weichel, W. und Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS, *Cytometry* 11 [2], Seite 231-8.
- Mingari, M. C.; Vitale, C.; Romagnani, C.; Falco, M. und Moretta, L. (2001): p75/AIRM1 and CD33, two sialoadhesin receptors that regulate the proliferation or the survival of normal and leukemic myeloid cells, *Immunol Rev* 181, Seite 260-8.
- Mizoguchi, H.; O'Shea, J. J.; Longo, D. L.; Loeffler, C. M.; McVicar, D. W. und Ochoa, A. C. (1992): Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice, *Science* 258 [5089], Seite 1795-8.
- Mizuno, S.; Emi, N.; Kasai, M.; Ishitani, A. und Saito, H. (2000): Aberrant expression of HLA-G antigen in interferon gamma-stimulated acute myelogenous leukaemia, *Br J Haematol* 111 [1], Seite 280-2.
- Moertel, C. G.; O'Fallon, J. R.; Go, V. L.; O'Connell, M. J. und Thynne, G. S. (1986): The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging, and prognosis of colorectal cancer, *Cancer* 58 [3], Seite 603-10.
- Molife, R. und Hancock, B. W. (2002): Adjuvant therapy of malignant melanoma, *Crit Rev Oncol Hematol* 44 [1], Seite 81-102. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12399001
- Montel, A. H.; Bochan, M. R.; Goebel, W. S. und Brahmi, Z. (1995a): Fas-mediated cytotoxicity remains intact in perforin and granzyme B antisense transfectants of a human NK-like cell line, *Cell Immunol* 165 [2], Seite 312-7.

- Montel, A. H.; Morse, P. A. und Brahmi, Z. (1995b): Upregulation of B7 molecules by the Epstein-Barr virus enhances susceptibility to lysis by a human NK-like cell line, *Cell Immunol* 160 [1], Seite 104-14.
- Moretta, A.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Mingari, M. C. und Moretta, L. (2000a): Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity, *Immunol Today* 21 [5], Seite 228-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.biomednet.com/library/abstract/IT.etd00310_01675699_v0021i05_00001596
- Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Cantoni, C.; Mingari, M. C.; Biassoni, R. und Moretta, L. (2001): Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity, *Annu Rev Immunol* 19, Seite 197-223. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://immunol.annualreviews.org/cgi/content/abstract/19/1/197>
- Moretta, A.; Sivori, S.; Vitale, M.; Pende, D.; Morelli, L.; Augugliaro, R.; Bottino, C. und Moretta, L. (1995): Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells, *J Exp Med* 182 [3], Seite 875-84.
- Moretta, L.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Mingari, M. C. und Moretta, A. (2000b): Human NK-cell receptors, *Immunol Today* 21 [9], Seite 420-2. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.biomednet.com/library/abstract/IT.etd00456_01675699_v0021i09_00001673
- Moretta, L.; Ferlazzo, G.; Mingari, M. C.; Melioli, G. und Moretta, A. (2003): Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells, *Vaccine* 21 Suppl 2, Seite S38-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12763681
- Moritz, D. und Groner, B. (1995): A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity, *Gene Ther* 2 [8], Seite 539-46.
- Moritz, D.; Wels, W.; Mattern, J. und Groner, B. (1994): Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 [10], Seite 4318-22.
- Mucke, S.; Polack, A.; Pawlita, M.; Zehnpfennig, D.; Massoudi, N.; Bohlen, H.; Doerfler, W.; Bornkamm, G.; Diehl, V. und Wolf, J. (1997): Suitability of Epstein-Barr virus-based episomal vectors for expression of cytokine genes in human lymphoma cells, *Gene Ther* 4 [2], Seite 82-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9081710
- Murakami, M.; Kuroki, M.; Arakawa, F.; Haruno, M.; Kuwahara, M.; Ozaki, H.; Senba, T. und Matsuoka, Y. (1996): Binding reactivity of monoclonal anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibodies with cell membrane-bound CEA and with free CEA in solution, *Immunol Invest* 25 [1-2], Seite 23-35.
- Murakami, M.; Kuroki, M.; Arakawa, F.; Kuwahara, M.; Oikawa, S.; Nakazato, H. und Matsuoka, Y. (1995): A reference of the GOLD classification of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen to the domain structure of the carcinoembryonic antigen molecule, *Hybridoma* 14 [1], Seite 19-28.
- Murphy, J.B. (1926): Monography, Rockefeller Institute of Medicine Research **21**, Seite **1-168**.
- Myking, A. (1969): Immunosuppression and cancer, *Lancet* 1 [7597], Seite 731.
- Nagashima, S.; Mailliard, R.; Kashii, Y.; Reichert, T. E.; Herberman, R. B.; Robbins, P. und Whiteside, T. L. (1998): Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization in vitro and in vivo, *Blood* 91 [10], Seite 3850-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/91/10/3850>
<http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/91/10/3850>
- Nagel, G.; Grunert, F.; Kuijpers, T. W.; Watt, S. M.; Thompson, J. und Zimmermann, W. (1993): Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66- related member of the carcinoembryonic antigen gene family, *Eur J Biochem* 214 [1], Seite 27-35.

Nakagoe, T.; Sawai, T.; Tsuji, T.; Jibiki, M. A.; Nanashima, A.; Yamaguchi, H.; Yasutake, T.; Kurosaki, N.; Ayabe, H. und Arisawa, K. (2001): Preoperative serum levels of sialyl Lewis(a), sialyl Lewis(x), and sialyl Tn antigens as prognostic markers after curative resection for colorectal cancer, *Cancer Detect Prev* 25 [3], Seite 299-308. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11425272

Natarajan, K.; Dimasi, N.; Wang, J.; Mariuzza, R. A. und Margulies, D. H. (2002): Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination, *Annu Rev Immunol* 20, Seite 853-85. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://immunol.annualreviews.org/cgi/content/abstract/20/1/853>

Naylor, C.; Gilham, D. und Hawkins, R. (2001): Optimisation of Retroviral Transduction and Survival of Human Natural Killer Cells: Implications for Gene Therapy, *Molecular Therapy - The Forth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy (ASGT)*, Seattle, WA.

N'Cho, M.; Hobbs, J. A. und Brahmi, Z. (1999): Over-expression of multidrug resistance P-glycoprotein inhibits NK granule-mediated lytic ability without affecting the Fas lytic pathway, *Hum Immunol* 60 [3], Seite 223-30.

Nishihara, E.; Nagayama, Y.; Narimatsu, M.; Namba, H.; Watanabe, M.; Niwa, M. und Yamashita, S. (1998): Treatment of thyroid carcinoma cells with four different suicide gene/prodrug combinations in vitro, *Anticancer Res* 18 [3a], Seite 1521-5.

Nolan, K. F.; Yun, C. O.; Akamatsu, Y.; Murphy, J. C.; Leung, S. O.; Beecham, E. J. und Junghans, R. P. (1999): Bypassing immunization: optimized design of "designer T cells" against carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing tumors, and lack of suppression by soluble CEA, *Clin Cancer Res* 5 [12], Seite 3928-41.

North, R. J. (1982): Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells, *J Exp Med* 155 [4], Seite 1063-74.

Oberyszyn, T. M.; Conti, C. J.; Ross, M. S.; Oberyszyn, A. S.; Tober, K. L.; Rackoff, A. I. und Robertson, F. M. (1998): Beta2 integrin/ICAM-1 adhesion molecule interactions in cutaneous inflammation and tumor promotion, *Carcinogenesis* 19 [3], Seite 445-55.

Okayama, H. und Berg, P. (1982): High-efficiency cloning of full-length cDNA, *Mol Cell Biol* 2 [2], Seite 161-70.

Ortaldo, J. R.; Mason, A. T. und O'Shea, J. J. (1995): Receptor-induced death in human natural killer cells: involvement of CD16, *J Exp Med* 181 [1], Seite 339-44.

Overwijk, W. W.; Lee, D. S.; Surman, D. R.; Irvine, K. R.; Touloukian, C. E.; Chan, C. C.; Carroll, M. W.; Moss, B.; Rosenberg, S. A. und Restifo, N. P. (1999): Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [6], Seite 2982-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.pnas.org/cgi/content/full/96/6/2982>

Owens, R. J. und Young, R. J. (1994): The genetic engineering of monoclonal antibodies, *J Immunol Methods* 168 [2], Seite 149-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8308291

Parajuli, P.; Nishioka, Y.; Nishimura, N.; Singh, S. M.; Hanibuchi, M.; Nokihara, H.; Yanagawa, H. und Sone, S. (1999): Cytolysis of human dendritic cells by autologous lymphokine-activated killer cells: participation of both T cells and NK cells in the killing, *J Leukoc Biol* 65 [6], Seite 764-70.

Pardoll, D. (2003): Does the immune system see tumors as foreign or self?, *Annu Rev Immunol* 21, Seite 807-39. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12615893

Patel, S. D.; Moskalenko, M.; Smith, D.; Maske, B.; Finer, M. H. und McArthur, J. G. (1999): Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function, *Gene Ther* 6 [3], Seite 412-9.

- Patel, S. D.; Moskalenko, M.; Tian, T.; Smith, D.; McGuinness, R.; Chen, L.; Winslow, G. A.; Kashmiri, S.; Schlom, J.; Stanners, C. P.; Finer, M. H. und McArthur, J. G. (2000): T-cell killing of heterogenous tumor or viral targets with bispecific chimeric immune receptors, *Cancer Gene Ther* 7 [8], Seite 1127-34.
- Paul, P.; Rouas-Freiss, N.; Khalil-Daher, I.; Moreau, P.; Riteau, B.; Le Gal, F. A.; Avril, M. F.; Dausset, J.; Guillet, J. G. und Carosella, E. D. (1998): HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [8], Seite 4510-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9539768
- Payne, A. S. und Cornelius, L. A. (2002): The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis, *J Invest Dermatol* 118 [6], Seite 915-22.
- Penn, I. (2000): Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression, *Drug Saf* 23 [2], Seite 101-13.
- Persic, L.; Righi, M.; Roberts, A.; Hoogenboom, H. R.; Cattaneo, A. und Bradbury, A. (1997): Targeting vectors for intracellular immunisation, *Gene* 187 [1], Seite 1-8.
- Philben, V. J.; Jakowatz, J. G.; Beatty, B. G.; Vlahos, W. G.; Paxton, R. J.; Williams, L. E.; Shively, J. E. und Beatty, J. D. (1986): The effect of tumor CEA content and tumor size on tissue uptake of indium 111-labeled anti-CEA monoclonal antibody, *Cancer* 57 [3], Seite 571-6.
- Pluckthun, A. (1991): Antibody engineering: advances from the use of Escherichia coli expression systems, *Biotechnology (N Y)* 9 [6], Seite 545-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1367224
- Polakova, K. und Russ, G. (2000): Expression of the non-classical HLA-G antigen in tumor cell lines is extremely restricted, *Neoplasma* 47 [6], Seite 342-8.
- Potter, K. N.; Li, Y. und Capra, J. D. (1993): Antibody production in the baculovirus expression system, *Int Rev Immunol* 10 [2-3], Seite 103-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8360578
- Power, C. A. (2003): Knock out models to dissect chemokine receptor function in vivo, *J Immunol Methods* 273 [1-2], Seite 73-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12535799
- Prado, I. B.; Laudanna, A. A. und Carneiro, C. R. (1995): Susceptibility of colorectal-carcinoma cells to natural-killer-mediated lysis: relationship to CEA expression and degree of differentiation, *Int J Cancer* 61 [6], Seite 854-60.
- Pross, H. F. und Lotzova, E. (1993): Role of natural killer cells in cancer, *Nat Immun* 12 [4-5], Seite 279-92.
- Rabinowich, H.; Reichert, T. E.; Kashii, Y.; Gastman, B. R.; Bell, M. C. und Whiteside, T. L. (1998): Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes, *J Clin Invest* 101 [11], Seite 2579-88. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jci.org/cgi/content/full/101/11/2579>
- Rabinowich, H.; Suminami, Y.; Reichert, T. E.; Crowley-Nowick, P.; Bell, M.; Edwards, R. und Whiteside, T. L. (1996): Expression of cytokine genes or proteins and signaling molecules in lymphocytes associated with human ovarian carcinoma, *Int J Cancer* 68 [3], Seite 276-84.
- Ramm, K. und Pluckthun, A. (2000): The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity in vitro, *J Biol Chem* 275 [22], Seite 17106-13.
- Ran, S.; Gao, B.; Duffy, S.; Watkins, L.; Rote, N. und Thorpe, P. E. (1998): Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature, *Cancer Res* 58 [20], Seite 4646-53.

- Raulet, D. H. und Held, W. (1995): Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition, *Cell* 82 [5], Seite 697-700. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7671299
- Reese, M. R. und Chow, D. A. (1992): Tumor progression in vivo: increased soybean agglutinin lectin binding, N-acetylgalactosamine-specific lectin expression, and liver metastasis potential, *Cancer Res* 52 [19], Seite 5235-43. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1394127
- Reichert, T. E.; Rabinowich, H.; Johnson, J. T. und Whiteside, T. L. (1998): Mechanisms responsible for signaling and functional defects, *J Immunother* 21 [4], Seite 295-306.
- Reinhold, U.; Liu, L.; Ludtke Handjery, H. C.; Heuser, C.; Hombach, A.; Wang, X.; Tilgen, W.; Ferrone, S. und Abken, H. (1999): Specific lysis of melanoma cells by receptor grafted T cells is enhanced by anti-idiotypic monoclonal antibodies directed to the scFv domain of the receptor, *J Invest Dermatol* 112 [5], Seite 744-50.
- Ren Heidenreich, L.; Hayman, G. T. und Trevor, K. T. (2000): Specific targeting of EGP-2+ tumor cells by primary lymphocytes modified with chimeric T cell receptors, *Hum Gene Ther* 11 [1], Seite 9-19.
- Ren-Heidenreich, L.; Mordini, R.; Hayman, G. T.; Siebenlist, R. und LeFever, A. (2002): Comparison of the TCR zeta-chain with the FcR gamma-chain in chimeric TCR constructs for T cell activation and apoptosis, *Cancer Immunol Immunother* 51 [8], Seite 417-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12202902
- Renkvist, N.; Castelli, C.; Robbins, P. F. und Parmiani, G. (2001): A listing of human tumor antigens recognized by T cells, *Cancer Immunol Immunother* 50 [1], Seite 3-15.
- Renner, C.; Kubuschok, B.; Trumper, L. und Pfreundschuh, M. (2001): Clinical approaches to vaccination in oncology, *Ann Hematol* 80 [5], Seite 255-66. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11446727
- Rickles, F. R.; Shoji, M. und Abe, K. (2001): The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer, *Int J Hematol* 73 [2], Seite 145-50.
- Riddell, S. R.; Elliott, M.; Lewinsohn, D. A.; Gilbert, M. J.; Wilson, L.; Manley, S. A.; Lupton, S. D.; Overell, R. W.; Reynolds, T. C.; Corey, L. und Greenberg, P. D. (1996): T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients, *Nat Med* 2 [2], Seite 216-23.
- Rivoltini, L.; Cattoretti, G.; Arienti, F.; Mastroianni, A. und Parmiani, G. (1992): CEA and NCA expressed by colon carcinoma cells affect their interaction with and lysability by activated lymphocytes, *Int J Biol Markers* 7 [3], Seite 143-7.
- Roberts, M. R.; Cooke, K. S.; Tran, A. C.; Smith, K. A.; Lin, W. Y.; Wang, M.; Dull, T. J.; Farson, D.; Zsebo, K. M. und Finer, M. H. (1998): Antigen-specific cytotoxicity by neutrophils and NK cells expressing chimeric immune receptors bearing zeta or gamma signaling domains, *J Immunol* 161 [1], Seite 375-84.
- Roberts, M. R.; Qin, L.; Zhang, D.; Smith, D. H.; Tran, A. C.; Dull, T. J.; Groopman, J. E.; Capon, D. J.; Byrn, R. A. und Finer, M. H. (1994): Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors, *Blood* 84 [9], Seite 2878-89.
- Roessig, C.; Scherer, S. P.; Baer, A.; Vormoor, J.; Rooney, C. M.; Brenner, M. K. und Juergens, H. (2002): Targeting CD19 with genetically modified EBV-specific human T lymphocytes, *Ann Hematol* 81 Suppl 2, Seite S42-3. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12611072
- Romeo, C.; Amiot, M. und Seed, B. (1992): Sequence requirements for induction of cytotoxicity by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain, *Cell* 68 [5], Seite 889-97. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1547489

Roncarolo, M. G.; Bigler, M.; Haanen, J. B.; Yssel, H.; Bacchetta, R.; de Vries, J. E. und Spits, H. (1991): Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens, *J Immunol* 147 [3], Seite 781-7. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1861074

Rooney, C. M.; Smith, C. A.; Ng, C. Y.; Loftin, S. K.; Sixbey, J. W.; Gan, Y.; Srivastava, D. K.; Bowman, L. C.; Krance, R. A.; Brenner, M. K. und Heslop, H. E. (1998): Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients, *Blood* 92 [5], Seite 1549-55.

Rooney, C. M.; Smith, C. A.; Ng, C. Y.; Loftin, S.; Li, C.; Krance, R. A.; Brenner, M. K. und Heslop, H. E. (1995): Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation, *Lancet* 345 [8941], Seite 9-13.

Rosenberg, S. A. (1991): Immunotherapy and gene therapy of cancer, *Cancer Res* 51 [18 Suppl], Seite 5074-5079.

Rosenberg, S. A.; Aebersold, P.; Cornetta, K.; Kasid, A.; Morgan, R. A.; Moen, R.; Karson, E. M.; Lotze, M. T.; Yang, J. C.; Topalian, S. L. und et al. (1990): Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction, *N Engl J Med* 323 [9], Seite 570-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=2381442

Rosenberg, S. A.; Yannelli, J. R.; Yang, J. C.; Topalian, S. L.; Schwartzentruber, D. J.; Weber, J. S.; Parkinson, D. R.; Seipp, C. A.; Einhorn, J. H. und White, D. E. (1994): Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2, *J Natl Cancer Inst* 86 [15], Seite 1159-66.

Rosenstein, M.; Eberlein, T. J. und Rosenberg, S. A. (1984): Adoptive immunotherapy of established syngeneic solid tumors: role of T lymphoid subpopulations, *J Immunol* 132 [4], Seite 2117-22.

Rossig, C.; Bollard, C. M.; Nuchtern, J. G.; Rooney, C. M. und Brenner, M. K. (2002): Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy, *Blood* 99 [6], Seite 2009-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11877273

Rott, L. S.; Briskin, M. J.; Andrew, D. P.; Berg, E. L. und Butcher, E. C. (1996): A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with beta 7 integrins and memory differentiation, *J Immunol* 156 [10], Seite 3727-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8621908

Rouas Freiss, N.; Marchal, R. E.; Kirszenbaum, M.; Dausset, J. und Carosella, E. D. (1997): The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [10], Seite 5249-54.

Ruggeri, L.; Capanni, M.; Martelli, M. F. und Velardi, A. (2001): Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation, *Curr Opin Hematol* 8 [6], Seite 355-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11604575

Ruggeri, L.; Capanni, M.; Urbani, E.; Perruccio, K.; Shlomchik, W. D.; Tosti, A.; Posati, S.; Rogaia, D.; Frassoni, F.; Aversa, F.; Martelli, M. F. und Velardi, A. (2002): Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants, *Science* 295 [5562], Seite 2097-100. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11896281

- Ryabova, L. A.; Desplancq, D.; Spirin, A. S. und Pluckthun, A. (1997): Functional antibody production using cell-free translation: effects of protein disulfide isomerase and chaperones, *Nat Biotechnol* 15 [1], Seite 79-84.
- Sahin, U.; Tureci, O. und Pfreundschuh, M. (1997): Serological identification of human tumor antigens, *Curr Opin Immunol* 9 [5], Seite 709-16.
- Salazar-Onfray, F.; Charo, J.; Petersson, M.; Frelund, S.; Noffz, G.; Qin, Z.; Blankenstein, T.; Ljunggren, H. G. und Kiessling, R. (1997): Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10, *J Immunol* 159 [7], Seite 3195-202. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi-bin/Retriever.cgi/v159n7/3195/3195-abs-frame.html>
- Sanchez, L.; Ayala, M.; Freyre, F.; Pedroso, I.; Bell, H.; Falcon, V. und Gavilondo, J. V. (1999): High cytoplasmic expression in *E. coli*, purification, and in vitro refolding of a single chain Fv antibody fragment against the hepatitis B surface antigen, *J Biotechnol* 72 [1-2], Seite 13-20.
- Sawyer, J. R.; Schlom, J. und Kashmiri, S. V. (1994): The effects of induction conditions on production of a soluble anti-tumor sFv in *Escherichia coli*, *Protein Eng* 7 [11], Seite 1401-6.
- Scanlan, M. J.; Chen, Y. T.; Williamson, B.; Gure, A. O.; Stockert, E.; Gordan, J. D.; Tureci, O.; Sahin, U.; Pfreundschuh, M. und Old, L. J. (1998): Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies, *Int J Cancer* 76 [5], Seite 652-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=9610721
- Schirrmann, T. und Pecher, G. (2001): Tumor-specific targeting of a cell line with natural killer cell activity by asialoglycoprotein receptor gene transfer, *Cancer Immunol Immunother* 50 [10], Seite 549-56.
- Schmiedl, A.; Breitling, F.; Winter, C. H.; Queitsch, I. und Dubel, S. (2000): Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*, *J Immunol Methods* 242 [1-2], Seite 101-14.
- Schubeler, D.; Lorincz, M. C.; Cimbor, D. M.; Telling, A.; Feng, Y. Q.; Bouhassira, E. E. und Groudine, M. (2000): Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation, *Mol Cell Biol* 20 [24], Seite 9103-12. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://mcb.asm.org/cgi/content/full/20/24/9103>
- Schwartz, M. A.; Lovett, D. R.; Redner, A.; Finn, R. D.; Graham, M. C.; Divgi, C. R.; Dantis, L.; Gee, T. S.; Andreeff, M.; Old, L. J. und et al. (1993): Dose-escalation trial of M195 labeled with iodine 131 for cytoreduction and marrow ablation in relapsed or refractory myeloid leukemias, *J Clin Oncol* 11 [2], Seite 294-303. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8426207
- Seliger, B.; Maeurer, M. J. und Ferrone, S. (1997): TAP off--tumors on, *Immunol Today* 18 [6], Seite 292-9.
- Selvakumar, A.; Steffens, U. und Dupont, B. (1996): NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains, *Tissue Antigens* 48 [4 Pt 1], Seite 285-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=8946682
- Shaheen, R. M.; Davis, D. W.; Liu, W.; Zebrowski, B. K.; Wilson, M. R.; Bucana, C. D.; McConkey, D. J.; McMahon, G. und Ellis, L. M. (1999): Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis, *Cancer Res* 59 [21], Seite 5412-6.
- Sharon, J. und Givol, D. (1976): Preparation of Fv fragment from the mouse myeloma XRPC-25 immunoglobulin possessing anti-dinitrophenyl activity, *Biochemistry* 15 [7], Seite 1591-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4096
- Shawler, D. L.; Bartholomew, R. M.; Garrett, M. A.; Trauger, R. J.; Dorigo, O.; Beveren, C. V.; Marchese, A.; Ferre, F.; Duffy, C.; Carlo, D. J.; Sherman, L. A.; Gold, D. P. und Sobol, R. E. (2002):

Antigenic and immunologic characterization of an allogeneic colon carcinoma vaccine, Clin Exp Immunol 129 [1], Seite 99-106.

Shibuya, A.; Campbell, D.; Hannum, C.; Yssel, H.; Franz-Bacon, K.; McClanahan, T.; Kitamura, T.; Nicholl, J.; Sutherland, G. R.; Lanier, L. L. und Phillips, J. H. (1996): DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes, Immunity 4 [6], Seite 573-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8673704

Shibuya, A.; Lanier, L. L. und Phillips, J. H. (1998): Protein kinase C is involved in the regulation of both signaling and adhesion mediated by DNAX accessory molecule-1 receptor, J Immunol 161 [4], Seite 1671-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9712030

Shibuya, K.; Lanier, L. L.; Phillips, J. H.; Ochs, H. D.; Shimizu, K.; Nakayama, E.; Nakauchi, H. und Shibuya, A. (1999): Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule, Immunity 11 [5], Seite 615-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10591186

Shigeoka, H.; Karsten, U.; Okuno, K. und Yasutomi, M. (1999): Inhibition of liver metastases from neuraminidase-treated colon 26 cells by an anti-Thomsen-Friedenreich-specific monoclonal antibody, Tumour Biol 20 [3], Seite 139-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10213921

Shiraki, K.; Tsuji, N.; Shioda, T.; Isselbacher, K. J. und Takahashi, H. (1997): Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas, Proc Natl Acad Sci U S A 94 [12], Seite 6420-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.pnas.org/cgi/content/full/94/12/6420>

Shores, E.; Flamand, V.; Tran, T.; Grinberg, A.; Kinet, J. P. und Love, P. E. (1997): Fc epsilonRI gamma can support T cell development and function in mice lacking endogenous TCR zeta-chain, J Immunol 159 [1], Seite 222-30. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi-bin/Retreiver.cgi/v159n1/222/222-abs-frame.html>

Silverman, D. H.; Delpassand, E. S.; Torabi, F.; Goy, A.; McLaughlin, P. und Murray, J. L. (2004): Radiolabeled antibody therapy in non-Hodgkins lymphoma: radiation protection, isotope comparisons and quality of life issues, Cancer Treat Rev 30 [2], Seite 165-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15023434

Skerra, A. und Pluckthun, A. (1988): Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli, Science 240 [4855], Seite 1038-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3285470

Smyth, M. J. (1995): Dual mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity serve to control and deliver the immune response, Bioessays 17 [10], Seite 891-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7487970

Sorachi, K.; Sugie, K.; Maekawa, N.; Takami, M.; Kawabe, T.; Kumagai, S.; Imura, H. und Yodoi, J. (1992): Induction and function of Fc epsilonRII on YT cells; possible role of ADF/thioredoxin in Fc epsilonRII expression, Immunobiology 185 [2-4], Seite 193-206 Mitte : Chirurgie : 156 (1979/80) - 199 (1998) Wedding : Med. Bibliothek : 156 (1979/80) -.

Stancovski, I.; Schindler, D. G.; Waks, T.; Yarden, Y.; Sela, M. und Eshhar, Z. (1993): Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors, J Immunol 151 [11], Seite 6577-82.

Stanislowski, T.; Voss, R. H.; Lotz, C.; Sadovnikova, E.; Willemsen, R. A.; Kuball, J.; Ruppert, T.; Bolhuis, R. L.; Melief, C. J.; Huber, C.; Stauss, H. J. und Theobald, M. (2001): Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer, Nat Immunol 2 [10], Seite 962-70.

Stauss, H. J. (1999): Immunotherapy with CTLs restricted by nonself MHC, *Immunol Today* 20 [4], Seite 180-3. 00001443 00001443.

Su, B.; Bochan, M. R.; Hanna, W. L.; Froelich, C. J. und Brahmi, Z. (1994): Human granzyme B is essential for DNA fragmentation of susceptible target cells, *Eur J Immunol* 24 [9], Seite 2073-80.

Szydlo, R.; Goldman, J. M.; Klein, J. P.; Gale, R. P.; Ash, R. C.; Bach, F. H.; Bradley, B. A.; Casper, J. T.; Flomenberg, N.; Gajewski, J. L.; Gluckman, E.; Henslee-Downey, P. J.; Hows, J. M.; Jacobsen, N.; Kolb, H. J.; Lowenberg, B.; Masaoka, T.; Rowlings, P. A.; Sondel, P. M.; van Bekkum, D. W.; van Rood, J. J.; Vowels, M. R.; Zhang, M. J. und Horowitz, M. M. (1997): Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings, *J Clin Oncol* 15 [5], Seite 1767-77.

Tachibana, M.; Takemoto, Y.; Nakashima, Y.; Kinugasa, S.; Kotoh, T.; Dhar, D. K.; Kohno, H. und Nagasue, N. (1998): Serum carcinoembryonic antigen as a prognostic factor in resectable gastric cancer, *J Am Coll Surg* 187 [1], Seite 64-8.

Takami, N.; Misumi, Y.; Kuroki, M.; Matsuoka, Y. und Ikehara, Y. (1988): Evidence for carboxyl-terminal processing and glycolipid-anchoring of human carcinoembryonic antigen, *J Biol Chem* 263 [25], Seite 12716-20.

Takamori, H.; Oades, Z. G.; Hoch, O. C.; Burger, M. und Schraufstatter, I. U. (2000): Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1, *Pancreas* 21 [1], Seite 52-6.

Tam, Y. K.; Maki, G.; Miyagawa, B.; Hennemann, B.; Tonn, T. und Klingemann, H. G. (1999): Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy, *Hum Gene Ther* 10 [8], Seite 1359-73.

Tam, Y. K.; Martinson, J. A.; Doligosa, K. und Klingemann, H. G. (2003): Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy, *Cytotherapy* 5 [3], Seite 259-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12850795

Taub, D. D.; Sayers, T. J.; Carter, C. R. und Ortaldo, J. R. (1995): Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity, *J Immunol* 155 [8], Seite 3877-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7561094

Tavladoraki, P.; Girotti, A.; Donini, M.; Arias, F. J.; Mancini, C.; Morea, V.; Chiaraluce, R.; Consalvi, V. und Benvenuto, E. (1999): A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both *Escherichia coli* and transgenic plants, *Eur J Biochem* 262 [2], Seite 617-24. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ejbiochem.org/cgi/content/full/262/2/617>

Teng, J. M.; Liu, X. R.; Mills, G. B. und Dupont, B. (1996): CD28-mediated cytotoxicity by the human leukemic NK cell line YT involves tyrosine phosphorylation, activation of phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C, *J Immunol* 156 [9], Seite 3222-32.

Thompson, J. A.; Eades-Perner, A. M.; Ditter, M.; Muller, W. J. und Zimmermann, W. (1997): Expression of transgenic carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor-prone mice: an animal model for CEA-directed tumor immunotherapy, *Int J Cancer* 72 [1], Seite 197-202.

Thompson, J.; Epting, T.; Schwarzkopf, G.; Singhofen, A.; Eades-Perner, A. M.; van Der Putten, H. und Zimmermann, W. (2000): A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy, *Int J Cancer* 86 [6], Seite 863-9.

Thomson, D. M.; Krupey, J.; Freedman, S. O. und Gold, P. (1969): The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system, *Proc Natl Acad Sci U S A* 64 [1], Seite 161-7.

Timonen, T.; Gahmberg, C. G. und Patarroyo, M. (1990): Participation of CD11a-c/CD18, CD2 and RGD-binding receptors in endogenous and interleukin-2-stimulated NK activity of CD3-negative large granular lymphocytes, *Int J Cancer* 46 [6], Seite 1035-40.

Tonn, T.; Becker, S.; Esser, R.; Schwabe, D. und Seifried, E. (2001): Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92, *J Hematother Stem Cell Res* 10 [4], Seite 535-44. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11522236

Topalian, S. L.; Solomon, D. und Rosenberg, S. A. (1989): Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas, *J Immunol* 142 [10], Seite 3714-25.

Tran, A. C.; Zhang, D.; Byrn, R. und Roberts, M. R. (1995): Chimeric zeta-receptors direct human natural killer (NK) effector function to permit killing of NK-resistant tumor cells and HIV-infected T lymphocytes, *J Immunol* 155 [2], Seite 1000-9.

Trotta, R.; Puorro, K. A.; Paroli, M.; Azzoni, L.; Abebe, B.; Eisenlohr, L. C. und Perussia, B. (1998): Dependence of both spontaneous and antibody-dependent, granule exocytosis-mediated NK cell cytotoxicity on extracellular signal- regulated kinases, *J Immunol* 161 [12], Seite 6648-56. URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi-bin/Retreiver.cgi/v161n12/6648/6648-abs-frame.html>

Tsumoto, K.; Nakaoki, Y.; Ueda, Y.; Ogasahara, K.; Yutani, K.; Watanabe, K. und Kumagai, I. (1994): Effect of the order of antibody variable regions on the expression of the single-chain HyHEL10 Fv fragment in *E. coli* and the thermodynamic analysis of its antigen-binding properties, *Biochem Biophys Res Commun* 201 [2], Seite 546-51. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8002985

Tureci, O.; Sahin, U.; Schobert, I.; Koslowski, M.; Scmitt, H.; Schild, H. J.; Stenner, F.; Seitz, G.; Rammensee, H. G. und Pfreundschuh, M. (1996): The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40, *Cancer Res* 56 [20], Seite 4766-72.

Tureci, O.; Sahin, U.; Zwick, C.; Neumann, F. und Pfreundschuh, M. (1999): Exploitation of the antibody repertoire of cancer patients for the identification of human tumor antigens, *Hybridoma* 18 [1], Seite 23-8.

Uckert, W.; Willmsky, G.; Pedersen, F. S.; Blankenstein, T. und Pedersen, L. (1998): RNA levels of human retrovirus receptors Pit1 and Pit2 do not correlate with infectibility by three retroviral vector pseudotypes, *Hum Gene Ther* 9 [17], Seite 2619-27.

Uharek, L.; Zeis, M.; Glass, B.; Steinmann, J.; Dreger, P.; Gassmann, W.; Schmitz, N. und Muller Ruchholtz, W. (1996): High lytic activity against human leukemia cells after activation of allogeneic NK cells by IL-12 and IL-2, *Leukemia* 10 [11], Seite 1758-64.

Uherek, C.; Tonn, T.; Uherek, B.; Becker, S.; Schnierle, B.; Klingemann, H. G. und Wels, W. (2002): Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2- expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction, *Blood* 100 [4], Seite 1265-73. URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/100/4/1265>

Uzzo, R. G.; Rayman, P.; Kolenko, V.; Clark, P. E.; Bloom, T.; Ward, A. M.; Molto, L.; Tannenbaum, C.; Worford, L. J.; Bukowski, R.; Tubbs, R.; Hsi, E. D.; Bander, N. H.; Novick, A. C. und Finke, J. H. (1999): Mechanisms of apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma, *Clin Cancer Res* 5 [5], Seite 1219-29.

van Oers, N. S.; Love, P. E.; Shores, E. W. und Weiss, A. (1998): Regulation of TCR signal transduction in murine thymocytes by multiple TCR zeta-chain signaling motifs, *J Immunol* 160 [1], Seite 163-70. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi-bin/Retreiver.cgi/v160n1/163/163-abs-frame.html>

Vanhove, M.; Usherwood, Y. K. und Hendershot, L. M. (2001): Unassembled Ig heavy chains do not cycle from BiP in vivo but require light chains to trigger their release, *Immunity* 15 [1], Seite 105-14. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11485742

- Visonneau, S.; Cesano, A.; Jeglum, K. A. und Santoli, D. (1999): Adoptive therapy of canine metastatic mammary carcinoma with the human MHC non-restricted cytotoxic T-cell line TALL-104, *Oncol Rep* 6 [6], Seite 1181-8.
- Visonneau, S.; Cesano, A.; Porter, D. L.; Luger, S. L.; Schuchter, L.; Kamoun, M.; Torosian, M. H.; Duffy, K.; Sickles, C.; Stadtmauer, E. A. und Santoli, D. (2000): Phase I trial of TALL-104 cells in patients with refractory metastatic breast cancer, *Clin Cancer Res* 6 [5], Seite 1744-54.
- Vitale, C.; Romagnani, C.; Falco, M.; Ponte, M.; Vitale, M.; Moretta, A.; Bacigalupo, A.; Moretta, L. und Mingari, M. C. (1999): Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [26], Seite 15091-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/96/26/15091>
- Vitale, C.; Romagnani, C.; Puccetti, A.; Olive, D.; Costello, R.; Chiossone, L.; Pitto, A.; Bacigalupo, A.; Moretta, L. und Mingari, M. C. (2001a): Surface expression and function of p75/AIRM-1 or CD33 in acute myeloid leukemias: engagement of CD33 induces apoptosis of leukemic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [10], Seite 5764-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/98/10/5764>
- Vitale, M.; Falco, M.; Castriconi, R.; Parolini, S.; Zambello, R.; Semenzato, G.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Moretta, L. und Moretta, A. (2001b): Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells, *Eur J Immunol* 31 [1], Seite 233-42.
- von Mehren, M.; Adams, G. P. und Weiner, L. M. (2003): Monoclonal antibody therapy for cancer, *Annu Rev Med* 54, Seite 343-69. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12525678
- Vujanovic, N. L.; Yasumura, S.; Hirabayashi, H.; Lin, W. C.; Watkins, S.; Herberman, R. B. und Whiteside, T. L. (1995): Antitumor activities of subsets of human IL-2-activated natural killer cells in solid tissues, *J Immunol* 154 [1], Seite 281-9.
- Walker, P. R.; Calzascia, T.; Schnuriger, V.; Chalmers, D.; Saas, P. und Dietrich, P. Y. (2000a): Loss of Fas (CD95/APO-1) expression by antigen-specific cytotoxic T cells is reversed by inhibiting DNA methylation, *Cell Immunol* 206 [1], Seite 51-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.idealibrary.com/links/citation/0008-8749/206/51>
- Walker, P. R.; Saas, P. und Dietrich, P. Y. (1997): Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back, *J Immunol* 158 [10], Seite 4521-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi-bin/Retreiver.cgi/v158n10/4521/4521-abs-frame.html>
- Walker, R. E.; Bechtel, C. M.; Natarajan, V.; Baseler, M.; Hege, K. M.; Metcalf, J. A.; Stevens, R.; Hazen, A.; Blaese, R. M.; Chen, C. C.; Leitman, S. F.; Palensky, J.; Wittes, J.; Davey, R. T., Jr.; Falloon, J.; Polis, M. A.; Kovacs, J. A.; Broad, D. F.; Levine, B. L.; Roberts, M. R.; Masur, H. und Lane, H. C. (2000b): Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection, *Blood* 96 [2], Seite 467-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10887107
- Wei, S.; Gamero, A. M.; Liu, J. H.; Daulton, A. A.; Valkov, N. I.; Trapani, J. A.; Lerner, A. C.; Weber, M. J. und Djeu, J. Y. (1998): Control of lytic function by mitogen-activated protein kinase/extracellular regulatory kinase 2 (ERK2) in a human natural killer cell line: identification of perforin and granzyme B mobilization by functional ERK2, *J Exp Med* 187 [11], Seite 1753-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jem.org/cgi/content/full/187/11/1753>
- Weijtens, M. E.; Hart, E. H. und Bolhuis, R. L. (2000): Functional balance between T cell chimeric receptor density and tumor associated antigen density: CTL mediated cytolysis and lymphokine production, *Gene Ther* 7 [1], Seite 35-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10680014
- Weijtens, M. E.; Willemsen, R. A.; Hart, E. H. und Bolhuis, R. L. (1998a): A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes, *Gene Ther* 5 [9], Seite 1195-203.

- Weijtens, M. E.; Willemsen, R. A.; Valerio, D.; Stam, K. und Bolhuis, R. L. (1996): Single chain Ig/gamma gene-redirected human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and recycle lytic capacity, *J Immunol* 157 [2], Seite 836-43.
- Weijtens, M. E.; Willemsen, R. A.; van Krimpen, B. A. und Bolhuis, R. L. (1998b): Chimeric scFv/gamma receptor-mediated T-cell lysis of tumor cells is coregulated by adhesion and accessory molecules, *Int J Cancer* 77 [2], Seite 181-7.
- Weinfeld, M.; Xing, J. Z.; Lee, J.; Leadon, S. A.; Cooper, P. K. und Le, X. C. (2001): Factors influencing the removal of thymine glycol from DNA in gamma-irradiated human cells, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68, Seite 139-49. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11554293
- Weissman, A. M.; Baniyash, M.; Hou, D.; Samelson, L. E.; Burgess, W. H. und Klausner, R. D. (1988): Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor, *Science* 239 [4843], Seite 1018-21.
- Whiteside, T. L. (1999): Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy, *Cancer Immunol Immunother* 48 [7], Seite 346-52.
- Whitlow, M.; Bell, B. A.; Feng, S. L.; Filpula, D.; Hardman, K. D.; Hubert, S. L.; Rollence, M. L.; Wood, J. F.; Schott, M. E.; Milenic, D. E. und et al. (1993): An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability, *Protein Eng* 6 [8], Seite 989-95.
- Wiedle, G.; Johnson-Leger, C. und Imhof, B. A. (1999): A chimeric cell adhesion molecule mediates homing of lymphocytes to vascularized tumors, *Cancer Res* 59 [20], Seite 5255-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10537306
- Willemsen, R. A.; Debets, R.; Hart, E.; Hoogenboom, H. R.; Bolhuis, R. L. und Chames, P. (2001): A phage display selected fab fragment with MHC class I-restricted specificity for MAGE-A1 allows for retargeting of primary human T lymphocytes, *Gene Ther* 8 [21], Seite 1601-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11894998
- Willemsen, R. A.; Weijtens, M. E.; Ronteltap, C.; Eshhar, Z.; Gratama, J. W.; Chames, P. und Bolhuis, R. L. (2000): Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR, *Gene Ther* 7 [16], Seite 1369-77.
- Williams, D. A. und Baum, C. (2003): Medicine. Gene therapy--new challenges ahead, *Science* 302 [5644], Seite 400-1. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14563994
- Wilson, J. L.; Charo, J.; Martin-Fontecha, A.; Dellabona, P.; Casorati, G.; Chambers, B. J.; Kiessling, R.; Bejarano, M. T. und Ljunggren, H. G. (1999): NK cell triggering by the human costimulatory molecules CD80 and CD86, *J Immunol* 163 [8], Seite 4207-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10510357
- Wu, A. M.; Chen, W.; Raubitschek, A.; Williams, L. E.; Neumaier, M.; Fischer, R.; Hu, S. Z.; Odom Maryon, T.; Wong, J. Y. und Shively, J. E. (1996): Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers, *Immunotechnology* 2 [1], Seite 21-36.
- Wu, T. T. und Kabat, E. A. (1970): An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity, *J Exp Med* 132 [2], Seite 211-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5508247
- Xu, J. L. und Davis, M. M. (2000): Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities, *Immunity* 13 [1], Seite 37-45. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.immunity.com/cgi/content/full/13/1/37>
- Yamabe, T.; Takakura, K.; Sugie, K.; Kitaoka, Y.; Takeda, S.; Okubo, Y.; Teshigawara, K.; Yodoi, J. und Hori, T. (1997): Induction of the 2B9 antigen/dipeptidyl peptidase IV/CD26 on human natural killer cells by IL-2, IL-12 or IL-15, *Immunology* 91 [1], Seite 151-8.

Yan, X. W.; Wong, J. Y.; Esteban, J. M.; Kuhn, J. A.; Beatty, B. G.; Beatty, J. D. und Shively, J. E. (1992): Effects of recombinant human gamma-interferon on carcinoembryonic antigen expression of human colon cancer cells, *J Immunother* 11 [2], Seite 77-84.

Yannelli, J. R.; Hyatt, C.; McConnell, S.; Hines, K.; Jacknin, L.; Parker, L.; Sanders, M. und Rosenberg, S. A. (1996): Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience, *Int J Cancer* 65 [4], Seite 413-21.

Yeatman, T. J.; Bland, K. I.; Copeland, E. M., 3rd und Kimura, A. K. (1989): Tumor cell-surface galactose correlates with the degree of colorectal liver metastasis, *J Surg Res* 46 [6], Seite 567-71.
URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2733419

Yew, N. S.; Wysokenski, D. M.; Wang, K. X.; Ziegler, R. J.; Marshall, J.; McNeilly, D.; Cherry, M.; Osburn, W. und Cheng, S. H. (1997): Optimization of plasmid vectors for high-level expression in lung epithelial cells, *Hum Gene Ther* 8 [5], Seite 575-84.

Yip, S.; Aboody, K. S.; Burns, M.; Imitola, J.; Boockvar, J. A.; Allport, J.; Park, K. I.; Teng, Y. D.; Lachyankar, M.; McIntosh, T.; O'Rourke, D. M.; Khoury, S.; Weissleder, R.; Black, P. M.; Weiss, W. und Snyder, E. Y. (2003): Neural stem cell biology may be well suited for improving brain tumor therapies, *Cancer J* 9 [3], Seite 189-204. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12952304

Yodoi, J.; Teshigawara, K.; Nikaido, T.; Fukui, K.; Noma, T.; Honjo, T.; Takigawa, M.; Sasaki, M.; Minato, N.; Tsudo, M. und et al. (1985): TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL 2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells), *J Immunol* 134 [3], Seite 1623-30.

Yoneda, N.; Tatsumi, E.; Kawano, S.; Teshigawara, K.; Oka, T.; Fukuda, M. und Yamaguchi, N. (1992): Detection of Epstein-Barr virus genome in natural-killer-like cell line, YT, *Leukemia* 6 [2], Seite 136-41.

Yun, C. O.; Nolan, K. F.; Beecham, E. J.; Reisfeld, R. A. und Junghans, R. P. (2000): Targeting of T lymphocytes to melanoma cells through chimeric anti-GD3 immunoglobulin T-cell receptors, *Neoplasia* 2 [5], Seite 449-59. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11191112

Zenner, G.; Vorherr, T.; Mustelin, T. und Burn, P. (1996): Differential and multiple binding of signal transducing molecules to the ITAMs of the TCR-zeta chain, *J Cell Biochem* 63 [1], Seite 94-103.